

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

RAQUEL BALESTRI HELENO FERREIRA

**LINAGLIPTINA: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO
INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ESTUDOS DE SEGURANÇA
BIOLÓGICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Uruguaiana
2016**

RAQUEL BALESTRI HELENO FERREIRA

**LINAGLIPTINA: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO
INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ESTUDOS DE SEGURANÇA
BIOLÓGICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Clésio Soldateli
Paim

**Uruguaiana
2016**

RAQUEL BALESTRI HELENO FERREIRA

**LINAGLIPTINA: DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO
INDICATIVO DE ESTABILIDADE POR CROMATOGRÁFIA
LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA E ESTUDOS DE SEGURANÇA
BIOLÓGICA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Controle de qualidade de fármacos, medicamentos e cosméticos.

Dissertação de mestrado aprovada e definida:
Banca examinadora:

Prof. Dr. Clésio Soldateli Paim
Orientador
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – UNIPAMPA

Prof. Dr. Marcelo Donadel Malesuik
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas - UNIPAMPA

Prof. Dr. Rafael Roehrs
Programa de Pós-graduação em Bioquímica - UNIPAMPA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo (a) autor
(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos
Institucionais).

F3831 Ferreira, Raquel Balestri Heleno

Linagliptina: Desenvolvimento de método indicativo de estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência e estudos de segurança biológica / Raquel Balestri Heleno Ferreira.

80 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, 2016.

"Orientação: Clésio Soldateli Paim".

1. Ciências Farmacêuticas . 2. Controle de Qualidade .
3. Indicativo de Estabilidade . I. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que todos os dias da minha vida me deu força pra eu nunca desistir.

A minha família, em especial aos meus pais Manoel e Jacira e meu irmão Rodrigo, por ser meu alicerce em vários momentos e que apesar da distância acompanharam meus passos e torceram por mim.

Ao meu querido e amado marido, Flávio, meu maior incentivador. O meu muito obrigada por me apoiar e acreditar em minha capacidade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Clésio Paim, pela disponibilidade, atenção dispensada, paciência, dedicação e por ser um exemplo de humildade e profissionalismo.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências farmacêuticas pela convivência e aprendizado oportunizado no decorrer desta jornada, na Unipampa.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências farmacêuticas.

A Universidade Federal do Pampa pelo apoio financeiro.

Ao Grupo de Pesquisa em Controle de Qualidade de Medicamentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio financeiro na compra dos padrões de linagliptina e das impurezas de síntese.

Ao laboratório de pesquisa e desenvolvimento em controle de qualidade.

Ao laboratório de análises de resíduos de pesticidas e micotoxinas – LaRPeM.

Ao laboratório de imunologia clínica e toxicologia.

Às amigas criadas no decorrer do mestrado em Ciências farmacêuticas, que ficarão para sempre marcadas. Em especial, Gabriela e Vanessa por termos estado juntas desde o início.

Quero expressar agradecimentos (e espero não pecar por esquecimento) a todos os meus amigos gaúchos, Aline, Glauco, Paula, Guilherme, Simone, Marcelo e Adriane por estarem ao meu lado continuamente e que de alguma forma contribuíram para elaboração desta dissertação.

RESUMO

A linagliptina (LGT) é um fármaco inibidor da DPP-4, da classe das gliptinas, utilizado para o controle glicêmico de diabetes mellitus tipo 2. Levando-se em conta que os fármacos utilizados no processo de produção das formulações farmacêuticas não são considerados totalmente puros, alguns Guias Regulatórios (ICH) descrevem a necessidade da quantificação do fármaco e suas impurezas de síntese. Diante disso, o objetivo do estudo é o desenvolvimento de um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para quantificação do fármaco e de suas três principais impurezas de síntese e o estudo de segurança biológica destas substâncias. O desenvolvimento e a validação do método para LGT e das três impurezas foram realizados por CLAE acoplada a um detector de arranjo de diodo (DAD), utilizando coluna C8 (5 μm - 4,6x100 mm), fase móvel eluída em modo gradiente, constituída de uma mistura de ácido fórmico 0,1% pH 3,5 e acetonitrila (ACN) eluída com uma rampa crescente de 10% na proporção de ACN de (0) zero ao 4 min (30% para 70%) e decrescente de 10% na proporção de ACN de 5 a 8 min (70% para 30%), vazão de 0,6 mL/min, volume de injeção de 20 μL e temperatura do forno de 30°C. Os comprimentos de onda de detecção utilizados foram 294, 278, 268 e 280 nm para LGT, impureza 1, 2 e 3, respectivamente. O método apresentou-se seletivo e específico para a LGT e as impurezas, pois não houve interferência dos produtos de degradação por Ultravioleta A, hidrólise básica (hidróxido de sódio 1,0 mol/L) e ácida (ácido clorídrico 1,0 mol/L), peróxido hidrogênio 30%, temperatura 60 °C e hidrólise básica e ácida em condições térmicas à 80 °C e dos excipientes na quantificação do fármaco. A resposta foi linear na faixa de 2,41-144,0 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0,9996$) para a LGT e na faixa de 0,06-3,6 $\mu\text{g/mL}$ para as impurezas testadas ($r = 0,9963$, $0,9994$ e $0,9991$ para impureza 1, 2 e 3, respectivamente). O método demonstrou exatidão, com teores de recuperação de 99,79, 93,12, 92,92 e 93,99% para a LGT e impureza 1, 2 e 3, respectivamente. A precisão intra e inter-dia foi satisfatória (RSD 1,36, 4,14, 3,50 e 4,08% para a LGT e impureza 1, 2 e 3, respectivamente) e a robustez não apresentou diferenças significativas com pequenas alterações nas condições analíticas (pH, fase móvel, temperatura, fluxo e detector). A cinética de degradação em condição alcalina associada a temperatura de (80 °C), apresentou resultados de primeira ordem. A avaliação da segurança biológica foi realizada por meio da citotoxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade através dos testes de viabilidade celular, micronúcleo e cometa, respectivamente. Nos testes de segurança biológica a LGT apresentou-se apenas citotóxica na concentração 10 vezes superior a concentração plasmática máxima, enquanto as impurezas 1 e 3 apresentaram-se citotóxica, mutagênica e genotóxica em uma concentração equivalente a 10% concentração plasmática máxima do fármaco e a impureza 2 evidenciou sua citotoxicidade e genotoxicidade na concentração equivalente a 10% da concentração plasmática máxima do fármaco. De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar que o método proposto foi indicativo de estabilidade por CLAE para LGT e ainda demonstrou-se adequado para análise quantitativa das impurezas de síntese do fármaco. Além disso, evidenciou-se que a LGT e as impurezas de síntese estão em conformidade com os testes de segurança biológica empregados, desde que utilizadas nas concentrações adequadas.

Palavras-chave: citotoxicidade, genotoxicidade, impurezas de síntese, linagliptina, método indicativo de estabilidade e mutagenicidade.

ABSTRACT

Linagliptin (LGT) is an inhibitor of DPP-4 used for glycemic control of type 2 mellitus diabetes. Since the drugs used in the production process of the pharmaceutical formulations are not considered totally pure, the Regulatory Guides describing the need of the drug quantification and impurities potentials. Therefore, the aim of this study was to develop a method by high-performance liquid chromatography to quantify the drug and three potential synthetic impurities and biological safety studies. The development and validation of the method for LGT and the three impurities were carried out by HPLC coupled to a photodiode array detector. The chromatographic separation was performed in a RP-8 column (150 x 4.6 mm, 5 μ m), at 30°C. The separation was performed by means of a linear gradient elution (eluent A: formic acid 0.1% pH 3.5; eluent B: acetonitrile). The gradient obeys the following sequence: 30-70% of B (0 - 4 minutes) and 70-30 of B (4,01 - 8 minutes) at a flow-rate of 0.6 mL min⁻¹ and run time of 10 minutes. The injection volume was 20 μ L and detection at 294, 278, 268 e 280 nm for LGT, impurity 1, 2 and 3, respectively. The method showed selectivity and specific for the LGT and synthetic impurities, therefore no interference of degradation products (UV-A, basic hydrolysis (sodium hydroxide 1.0 mol L⁻¹) and acid (hydrochloric acid 1.0 mol L⁻¹), peroxide (30%), temperature (60 ° C) and acidic and basic hydrolysis under thermal conditions (80° C)) and the excipients in the quantification of the drug. The response was linear from 2.41 to 144.0 μ g mL⁻¹ (r = 0.9996) for the LGT and in the range of 0.06 to 3.6 μ g mL⁻¹ (r = 0.9963, 0.9994 and 0.9991 for impurity 1, 2 and 3, respectively). The method showed accuracy, with recovery levels of 99.79, 93.12, 92.92 and 93.99% for LGT and impurity 1, 2 and 3, respectively. The intra and inter-day precision was suitable (RSD 1.36, 4.14, 3.50 and 4.08% for LGT and impurity 1, 2 and 3, respectively) and the robustness showed no significant differences with small changes in the analytical conditions (pH of the mobile phase, temperature, flow-rate and detector). The kinetics of degradation in alkaline conditions associated with temperature (80° C), showed results of the first order. The evaluation of the biological was performed by cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity through the cell viability test, micronucleus and comet, respectively. In biological safety testing LGT had only cytotoxic activity at a concentration of 10 times the maximum plasma concentration, while the impurity 1 and 3 set out cytotoxic, mutagenic and genotoxic in a concentration equivalent to 10% maximum plasma concentration of the drug and impurity 2 showed cytotoxicity and genotoxicity in concentration equivalent to 10% of the maximum plasma concentration of the drug. According to the results, it can be seen that the proposed method by HPLC is stability-indicating and suitable for quantitative analysis of the drug and synthetic impurities. Furthermore, it was observed that the LGT and synthetic impurities are in accordance with biological safety studies, if they are used in appropriate concentration.

Keywords: cytotoxicity, genotoxicity, synthesis impurities, linagliptin, indicative method of stability and mutagenicity

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura química das principais gliptinas presentes no mercado farmacêutico.	17
FIGURA 2 - Rota de síntese da linagliptina.....	25
FIGURA 3 – Teste de viabilidade celular utilizando azul de tripan. Obs.: as setas amarelas indicam células viáveis e a seta vermelha indica célula não viável.	29
FIGURA 4 – Estrutura do DNA.....	30
FIGURA 5 – Classificação dos nucleóides conforme o comprimento da cauda, pontuação de 0 (sem migração) a 4 (migração máxima).....	31
FIGURA 6 – Célula com presença de micronúcleos (MN)	32
FIGURA 7 – Impurezas de síntese da linagliptina.....	33
FIGURA 8 - Cromatograma da impureza 1 (3,91 min.), linagliptina (5,52 min.), impureza 2 (7,47 min.) e impureza 3 (8,42 min.).....	52
FIGURA 9 - Cromatogramas das condições de degradação em exposição a situações de estresse.....	56
FIGURA 10 - Cromatograma utilizado para avaliação da especificidade.	57
FIGURA 11 - Representação gráfica das curvas de calibração da linagliptina (a); impureza 1 (b); impureza 2 (c) e impureza 3 (d).....	58
FIGURA 12 - Gráficos das diferentes ordens de cinética da degradação de linagliptina-fármaco.	66
FIGURA 13 - Cromatogramas da cinética de degradação através da exposição da linagliptina em meio básico (hidróxido de sódio 1,0 mol/L) associado à temperatura (80 °C).....	67
FIGURA 14 - Gráfico do percentual da viabilidade celular frente à linagliptina-substância química de referência e impurezas.....	69
FIGURA 15 - Gráfico do percentual da frequência de micronúcleos frente à linagliptina-substância química de referência e impurezas.....	70
FIGURA 16 - Gráfico do percentual do índice de dano de DNA frente à linagliptina-substância química de referência e impurezas.....	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Parâmetros farmacocinéticos da LGT	21
TABELA 2 - Limites de impurezas relacionados ao relato, identificação ou qualificação de acordo com a dose administrada (ICH Q3A R2).....	24
TABELA 3 – Parâmetros avaliados para validação de métodos analíticos de acordo com a categoria do processo.....	27
TABELA 4 - Excipientes farmacêuticos presentes no medicamento Trayenta®, com suas respectivas funções, faixas percentuais utilizadas na produção de comprimidos e porcentagem utilizada para preparação do placebo.....	37
TABELA 5 – Condições cromatográficas testadas no modo de eluição isocrático	38
TABELA 6 - Preparo das soluções para avaliação da exatidão pelo método de adição de padrão (LGT-SQR).....	43
TABELA 7 - Fatores e níveis utilizados na avaliação da robustez do método analítico	45
TABELA 8 - Concentrações da linagliptina e impurezas 1, 2 e 3 que foram usadas no tratamento das culturas de leucócitos humanos.....	47
TABELA 9 - Condições cromatográficas utilizadas na validação do método por CLAE-DAD para determinação quantitativa de LGT e impurezas de síntese.....	51
TABELA 10 - Parâmetros de adequabilidade do sistema para o método analítico desenvolvido e resultados preconizados pelo FDA (1994)	53
TABELA 11 - Percentual de degradação da linagliptina em diferentes condições de estresse para avaliar a seletividade do método analítico.	54
TABELA 12 - Análise de variância dos resultados de linearidade da linagliptina e impurezas.....	59
TABELA 13 - Limite de detecção e quantificação da linagliptina e impurezas obtidos na validação do método analítico por CLAE.	60
TABELA 14 – Resultados de precisão intradia e interdia obtidos para a validação do método analítico por CLAE para a linagliptina impurezas	61
TABELA 15 - Resultados da exatidão obtidos pelo teste de recuperação para validação do método analítico por CLAE para determinação de LGT e impurezas de síntese.....	62
TABELA 16 - Parâmetros avaliados e respostas obtidas na robustez da linagliptina e impurezas.....	63

TABELA 17 - Respostas estatísticas da aplicação do teste T de Student através da comparação os parâmetros avaliados com o parâmetro nominal 64

TABELA 18 - Valores obtidos para construção dos gráficos e definição da ordem de reação de degradação do fármaco LGT nos comprimidos. 65

TABELA 19 - Parâmetros cinéticos calculados para fármaco de linagliptina. 67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila;

ANOVA – Análise de variância;

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária;

AV – Agência Valenciana de La Salud;

CCDAE – Cromatografia em camada delgada de alta eficiência;

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência;

DAD – Detector de arranjo de fotodiodos;

DM – *Diabetes mellitus*;

DNA – Ácido desoxirribonucleico;

DPP-IV – dipeptilpeptidase IV;

DPR – Desvio padrão relativo;

EMEA – Agência Europeia de Medicamentos;

FA – Fármaco;

FB – Farmacopeia Brasileira;

FDA – *Food and Drug Administration*;

GLP-1 – Peptídeo semelhante a glucagon 1;

GPI – Peptídeo insulínico dependente de glicose;

ICH – International Conference on Harmonization;

IMP – Impureza;

LD – Limite de detecção;

LGT – Linagliptina;

LGT-FA – Linagliptina-Fármaco;

LGT-FA-IMP – Linagliptina-Fármaco-Impureza;

LGT-SQR – Linagliptina-Substância química de referência;

LGT-SQR-IMP – Linagliptina-Substância química de referência-Impureza;

LQ – Limite de quantificação;

MeOH- Metanol;

MN – Micronúcleo;

OMS – Organização Mundial da Saúde;

PD – Produto de degradação;

UV – Espectrofotometria no ultravioleta;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
3.1 Gliptinas.....	17
3.1.1 Linagliptina	18
3.1.1.1 Aspectos gerais	18
3.1.1.2 Descrição do fármaco Linagliptina.....	18
3.1.1.3 Mecanismo de ação	19
3.1.1.4 Indicações	19
3.1.1.5 Efeitos adversos.....	19
3.1.1.6 Farmacocinética.....	20
3.2 Impurezas farmacêuticas.....	21
3.2.1 Aspectos gerais.....	21
3.2.2 Tipos de impurezas farmacêuticas	22
3.2.3 Legislação de impurezas	23
3.2.4 Impurezas de síntese da linagliptina.....	24
3.3 Validação de métodos analíticos para determinação de impurezas	25
3.4 Determinação quantitativa de gliptinas.....	27
3.5 Estudos de Segurança Biológica.....	28
3.5.1 Citotoxicidade	29
3.5.2 Genotoxicidade.....	30
3.5.2.1 Molécula de DNA.....	30
3.5.2.2 Danos e reparo de DNA.....	31
3.5.3 Mutagenicidade	32
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1 Produto farmacêutico e substâncias químicas de referência.....	33
4.2 Solventes e reagentes	34
4.3 Equipamentos.....	34
4.4 Metodologia	35
4.4.1 Desenvolvimento e validação do método analítico.....	35
4.4.1.1 Preparo das soluções estoque	35
4.4.1.1.1 Preparo da solução estoque de Linagliptina-Fármaco (LGT-FA)	35
4.4.1.1.2 Preparo da solução estoque de Linagliptina - substância química de referência (LGT-SQR).....	35
4.4.1.1.3 Preparo da solução estoque das impurezas farmacêuticas	36
4.4.1.1.4 Preparo da solução estoque do placebo	36
4.4.1.1.5 Preparo da solução de trabalho de Linagliptina-substância química de referência e impurezas (LGT-SQR-IMP)	37
4.4.1.1.6 Preparo da solução de trabalho Linagliptina-fármaco e impurezas (LGT-FA-IMP)	38
4.4.1.2 Condições cromatográficas.....	38
4.4.1.3 Validação do método analítico	38

4.4.1.3.1 Seletividade e Especificidade	39
4.4.1.3.1.1 Degradação em meio ácido	39
4.4.1.3.1.2 Degradação em meio alcalino	39
4.4.1.3.1.3 Degradação térmica	40
4.4.1.3.1.4 Degradação ácida térmica	40
4.4.1.3.1.5 Degradação básica térmica	40
4.4.1.3.1.6 Degradação oxidativa (H ₂ O ₂ 30%)	41
4.4.1.3.1.7 Degradação fotolítica ultravioleta A (UV-A).....	41
4.4.1.3.2 Linearidade	41
4.4.1.3.2.1 Linearidade da LGT-SQR	42
4.4.1.3.2.2 Linearidade das impurezas	42
4.4.1.3.3 Precisão	42
4.4.1.3.4 Exatidão	43
4.4.1.3.6 Robustez.....	44
4.4.1.4 Avaliação da cinética de degradação da solução de LGT nos comprimidos em condições alcalinas em presença de temperatura (NaOH 1,0 mol/L a 80 °C)	45
4.4.1.4.1 Definição da ordem de reação	45
4.4.2 Análise da segurança biológica	46
4.4.2.1 Obtenção da matriz sanguínea	46
4.4.2.2 Preparo da solução de linagliptina-substância química de referência	46
4.4.2.3 Preparo das impurezas 1, 2 e 3	46
4.4.2.4 Preparo da Cultura de Leucócitos Humanos	47
4.4.2.5 Tratamento da cultura de leucócitos	47
4.4.2.6 Avaliação dos parâmetros citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em cultura de leucócitos humanos.....	48
4.4.2.6.1 Viabilidade celular (teste com Azul de Tripán).....	48
4.4.2.6.2 Teste de Micronúcleo.....	48
4.4.2.6.3 Teste cometa	49
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
5.1 Validação do método analítico da determinação de linagliptina e impurezas por CLAE	50
5.1.1 Otimização do método cromatográfico	50
5.1.2 Seletividade	53
5.1.3 Linearidade.....	58
5.1.4 Limite de detecção e quantificação	59
5.1.5 Precisão	60
5.1.6 Exatidão.....	61
5.1.7 Robustez	62
5.1.9 Cinética de degradação.....	64
5.2 Segurança biológica do fármaco LTG e suas impurezas de síntese	68
5.2.1 Parâmetro citotóxico - Viabilidade celular.....	68
5.2.2 Parâmetro mutagênico - Teste de Micronúcleo.....	69
5.2.3 Parâmetro genotoxicológico - Teste Cometa	71
6. CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	75

1. INTRODUÇÃO

Diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica, não transmissível, classificada em três tipos: diabetes gestacional, aumento relativo de glicose durante a gravidez; DM tipo 1, caracterizada pela destruição imunológica das células beta pancreáticas em indivíduos geneticamente suscetíveis com deficiência absoluta de insulina e; DM tipo 2, caracterizada pelo distúrbio de secreção de insulina, resistência à insulina nos tecidos alvos ou pela dessensibilização dos receptores de insulina (FILHO, 2011).

A DM vem sendo considerada um dos maiores problemas de saúde mundial, pois de acordo a Organização Mundial da Saúde (OMS) esta patologia afeta aproximadamente 422 milhões de indivíduos em todo o mundo, com projeção de duplicar nos próximos 20 anos (OMS, 2016). No Brasil, segundo estimativas, já são mais de 12 milhões de portadores da doença (SBEM, 2014) e 90% dos casos de DM são representados pelo DM tipo 2 (OMS, 2016). Nesse contexto, torna-se imprescindível o desenvolvimento de novos fármacos que auxiliem no controle glicêmico destes pacientes.

Com esta finalidade, a Boehringer Ingelheim[®] lançou em 2009 uma classe de novos fármacos conhecida como gliptinas ou inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4). Dentro desta classe a LGT vem sendo utilizada como uma alternativa no controle da DM tipo 2. Estes fármacos aumentam a secreção de insulina dependente de glicose e diminuem a secreção de glucagon. Seu mecanismo de ação é estabilizar o GLP-1 endógeno pela inibição da enzima que o degrada, a DPP-4. Pacientes com DM2 apresentam diminuição dos níveis de GLP-1 no estado pós-prandial, contribuindo para a redução do estímulo fisiológico da secreção de insulina e não permitindo a supressão do glucagon, portanto, o uso de inibidores dessa enzima aumentam em duas a três vezes os níveis de GLP-1 ativo (SBD, 2009; SBD, 2014).

Tendo como premissa que os fármacos utilizados no processo de formulações farmacêuticas não são considerados totalmente puros e a inexistência de relatos de detecção e quantificação de impurezas farmacêuticas presentes no fármaco linagliptina, objetiva-se o desenvolvimento e a validação de um método analítico indicativo de

estabilidade por CLAE para quantificar o fármaco e suas principais impurezas de síntese e avaliar a segurança biológica destas substâncias utilizando ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e validar um método analítico indicativo de estabilidade por CLAE para a determinação quantitativa de LGT e de suas principais impurezas de síntese em comprimidos revestidos, bem como realizar estudos de segurança biológica do fármaco e suas principais impurezas de síntese.

2.2 Objetivos específicos

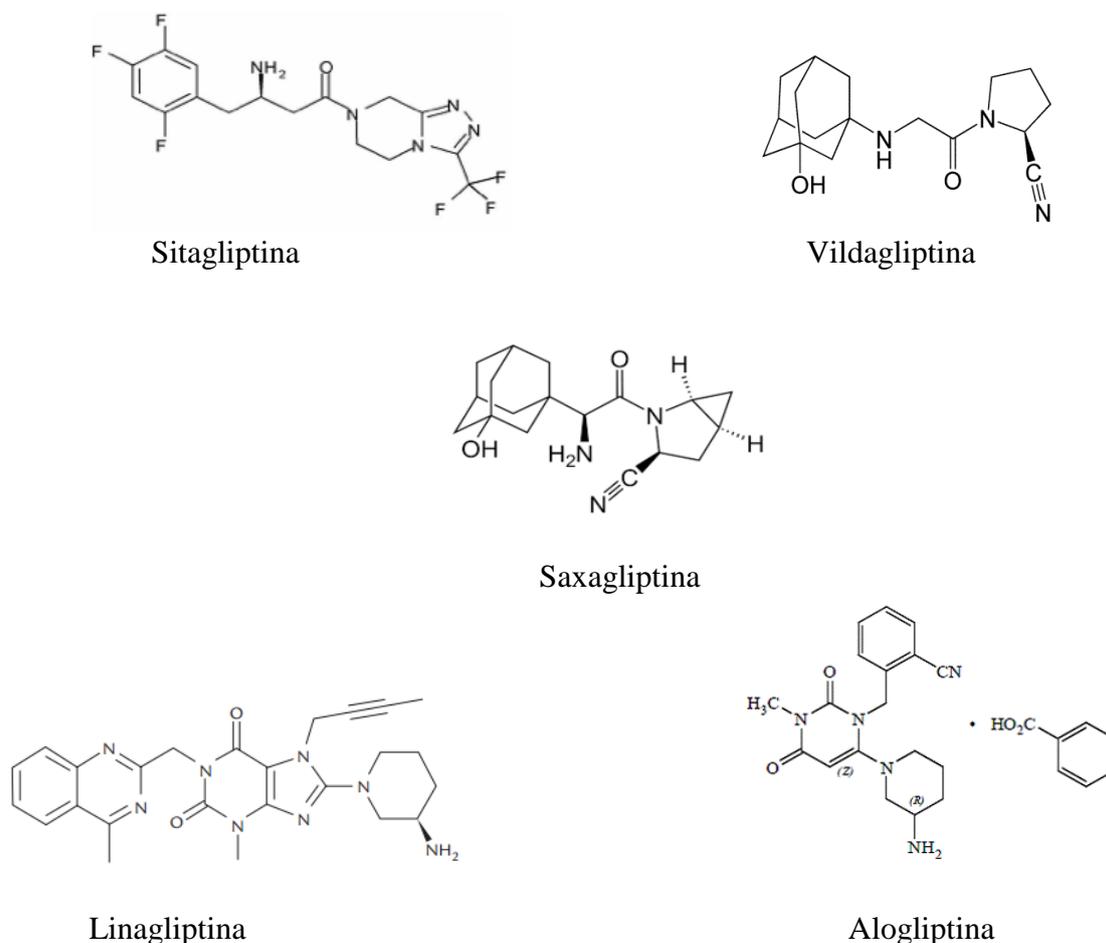
- Desenvolver e validar um método de análise por CLAE indicativo de estabilidade para quantificação da LGT e suas principais impurezas;
- Avaliar a estabilidade do fármaco LGT em comprimidos revestidos de 5 mg, submetendo-os ao estresse térmico (60 °C), oxidativo (H₂O₂ 30%), fotólise (UV-A) e à hidrólise em meio ácido e meio básico (1,0 mol/L) com e sem temperatura (80 °C) ;
- Determinar a cinética de degradação do medicamento LGT quando submetidos a hidrólise básica (1,0 mol/L) em presença de temperatura (80 °C);
- Avaliar a citotoxicidade da linagliptina e suas principais impurezas por meio do teste de viabilidade celular;
- Avaliar a genotoxicidade da linagliptina e suas principais impurezas por meio do teste do cometa;
- Avaliar mutagenicidade da linagliptina e suas principais impurezas por meio do teste de micronúcleo.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Gliptinas

As gliptinas são agentes antidiabéticos orais, constituintes de uma nova classe terapêutica, amplamente utilizada para o tratamento de diabetes mellitus tipo 2 (DM-2). Estes fármacos são inibidores da dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), enzima que degrada as incretinas em formas inativas (FERREIRA, 2014; SBD, 2013). O primeiro medicamento desta classe terapêutica a ser comercializado foi o fosfato de sitagliptina (Januvia[®]), no entanto, atualmente existe uma série de análogos no mercado farmacêutico: vildagliptina (Galvus[®]), saxagliptina (Onglyza[®]), linagliptina (Trayenta[®]) e alogliptina (Nesina[®]), conforme apresenta a figura 1 (PAULA, 2014; SBD, 2013; RX LIST, 2015).

FIGURA 1 - Estrutura química das principais gliptinas presentes no mercado farmacêutico.



Fonte: Biftu, 2013

3.1.1 Linagliptina

3.1.1.1 Aspectos gerais

A LGT foi aprovada para comercialização nos Estados Unidos em maio de 2011 (FDA, 2011). No Brasil teve seu registro aprovado para comercialização pela Boehringer Ingelheim em parceria com a Eli Lilly em julho de 2011, na forma de comprimidos revestidos de 5 mg, com o nome comercial de Trayenta[®] (BRASIL, 2011).

3.1.1.2 Descrição do fármaco Linagliptina

Nome químico da linagliptina: {1H - purina -2,6 - diona , 8-[(3R)-3-amino-1-piperidiny]-7-(2-butyn-1-yl)-3,7-dihydro-3-methyl-1-[(4-methyl-2-quinazoliny)methyl]} (SUJATHA; RAO, 2013);

Registro no Chemical Abstracts (CAS): 68270-12-0; (TRADJENTA, 2014)

Fórmula molecular: C₂₅H₂₈N₈O₂ (ARCHANA; SRIRAM; GAYASUDDIN, 2013);

Massa molecular: 472,54 g/mol (ACD/LABS, 2010);

Faixa de fusão: 202 a 209°C (ECKHARDT et al, 2007);

Aspecto: Pó branco a amarelado, apresentando-se como substância sólida ligeiramente higroscópica (ARCHANA; SRIRAM; GAYASUDDIN, 2013);

Solubilidade: Ligeiramente solúvel em água (0,9 mg/mL), sóluvel em metanol (60 mg/mL), moderadamente solúvel em etanol (10 mg/mL), ligeiramente solúvel em isopropanol e em acetona (1 mg/mL) (ARCHANA; SRIRAM; GAYASUDDIN, 2013).

Valor de pKa: Duas constantes nos valores de 8,6 e 1,9 referentes à protonação da amina primária e do grupo quinazolina, respectivamente (FDA, 2011).

3.1.1.3 Mecanismo de ação

A LGT é um fármaco inibidor da enzima dipeptidil peptidase 4 (DPP-4), uma enzima responsável pela inativação das hormonas incretinas GLP-1 e GIP (peptídeo-1 semelhante ao glucagon e polipeptídeo insulínico dependente da glicose). Estas incretinas estão envolvidas na regulação fisiológica da homeostase da glicose e são rapidamente degradadas pela enzima DPP-4. As incretinas são liberadas a um baixo nível durante o dia, no entanto, após as refeições tem seu nível elevado imediatamente. A GLP-1 e a GIP aumentam a biossíntese e a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas na presença de níveis séricos glicêmicos elevados e normais. Ao mesmo tempo, a GLP-1 reduz a secreção de glucagon pelas células alfa pancreáticas, ocasionando uma diminuição da produção hepática de glicose. A linagliptina liga-se de forma eficaz e reversível à DPP-4, originando uma elevação sustentada dos níveis de incretinas e um prolongamento da sua atividade, assim faz com que aumente de forma dependente da glicose a secreção de insulina e reduza a secreção de glucagon, o que por fim resulta numa melhora da homeostase da glicose (RX LIST, 2015).

3.1.1.4 Indicações

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) aprovou o fármaco linagliptina na apresentação de 5 mg, em dose única diária, para o tratamento do DM-2. Este medicamento tem como objetivo a redução de níveis de glicose na circulação sanguínea, no entanto, sua eficácia é aumentada quando associado à reeducação alimentar e prática de exercícios físicos diários (EMEA, 2012). A LGT pode ser administrada em monoterapia ou em associações com outros medicamentos antidiabéticos, como por exemplo: metformina, sulfonilureias, tiazolidinedionas e pioglitazona (SCHEEN, 2012).

3.1.1.5 Efeitos adversos

A segurança da linagliptina foi avaliada globalmente em pacientes com DM2, os quais receberam a dose diária de 5 mg. Nos estudos foram comparados o grupo placebo com os tratados com a dose terapêutica de 5 mg de linagliptina por 12 ou mais semanas.

Sendo que na análise agrupada, a incidência global de eventos adversos nos pacientes tratados com placebo foi similar à da linagliptina 5 mg (63,1% versus 60,3%). Porém com descontinuação da terapia os efeitos adversos foram mais elevados nos pacientes que receberam placebo, em comparação àqueles que receberam linagliptina 5 mg (4,4% versus 3,3%) (TRADJENTA, 2014; SCHEEN, 2012).

Os efeitos adversos da LGT foram analisados e são exibidos com base nos respectivos regimes de tratamento:

- Monoterapia (linagliptina 5 mg): nasofaringite e tosse (reações incomuns - > 1/1.000 e < 1/100) e hipersensibilidade e pancreatite (frequência ainda desconhecidas).
- Associação de outros antidiabéticos (metformina, pioglitazona, sulfonilureia e sulfonilureia + metformina): além das reações em monoterapia em alguns casos apresentaram ganho de peso, hipertrigliceridemia e hipoglicemia.

Outras ocorrências de efeitos adversos foram relatadas após comercialização do produto como *rash*, angioedema e urticária (NEUMILLER; SETTER, 2012; TRADJENTA, 2014).

3.1.1.6 Farmacocinética

A LGT é absorvida no trato gastrointestinal e não sofre interferência da alimentação. A tabela 1 apresenta os parâmetros farmacocinéticos deste fármaco.

TABELA 1 - Parâmetros farmacocinéticos da LGT

Parâmetros	Valores de referência observados	Referência
Tempo máximo plasmático (T máx)	1,75 h; 2h	NEUMILLER; SETTER, 2012; AV, 2012.
Concentração plasmática máxima (C máx)	8,32 nmol/L	NEUMILLER; SETTER, 2012.
Biodisponibilidade absoluta (F abs)	30%	EMEA, 2012; FDA, 2011.
Tempo de meia vida de eliminação (T ½)	131 h	NEUMILLER; SETTER, 2012.
Depuração renal no estado de equilíbrio	70 mL/min	EMEA, 2012.
Via de eliminação	Fezes (80%) e urina (5%). Em sua metabolização em média 90% da linagliptina é excretada na forma inalterada	TRADJENTA, 2014; FDA, 2011; EMEA, 2012.

3.2 Impurezas farmacêuticas

3.2.1 Aspectos gerais

Impurezas podem ser caracterizadas como qualquer substância química estranha e indesejável presente em fármacos e formulações farmacêuticas. A presença destas impurezas, mesmo em pequenas quantidades, pode influenciar a eficácia e a segurança dos produtos farmacêuticos. Devido a isso, compreender a origem e quais as possíveis impurezas presentes pode facilitar o desenvolvimento de fármacos mais puros, melhorando a qualidade do produto final (BASAK, 2007; ROY, 2002).

3.2.2 Tipos de impurezas farmacêuticas

As impurezas podem ser classificadas nas seguintes categorias: impurezas orgânicas, impurezas inorgânicas, solventes residuais e outros tipos de impurezas, tais como, formas polimórficas e esteroisômeros (NG; LUNN; FAUSTINO, 2007).

As impurezas orgânicas são derivadas de matérias-primas, subprodutos, intermediários, produtos de degradação, impurezas de síntese, reagentes e catalisadores e, podem surgir durante o processo de fabricação e/ou armazenamento da nova substância (ICH, 2006).

Sabe-se que algumas impurezas podem ser formadas da degradação do fármaco ou do produto farmacêutico e que resultam de alterações químicas ocorridas no processo de síntese do fármaco ou durante o armazenamento, devido a fatores como, luz, temperatura, oxidação ou umidade. Além disso, produtos de degradação também podem ser originados da interação do fármaco com excipiente da formulação ou do próprio contato com sua embalagem primária (ICH, 2006).

As impurezas inorgânicas podem ser resultados do seu processo de fabricação, podendo ser reagentes, catalisadores, metais pesados, tampões e outros materiais utilizados no processo de síntese (ICH, 2006).

Os solventes residuais são líquidos inorgânicos ou orgânicos utilizados como veículos para a preparação de soluções ou suspensões na síntese de uma nova substância. Sendo, classificados de acordo com o grau de risco à saúde humana, sendo elas:

- Classe 1: Carcinogênicos, alta toxicidade (ex. benzeno e tetracloreto de carbono);
- Classe 2: Toxicidade intermediária (ex. diclorometano, metanol, piridina, tolueno e acetonitrila);
- Classe 3: Baixo potencial tóxico (ex. ácido acético, acetona, álcool isopropílico, butanol, etanol e acetato de etila) (ICH, 2006).

Impurezas polimórficas são oriundas do processo de polimorfismo, ou seja, capacidade de uma substância de existir em mais de uma forma cristalina. Diferentes formas cristalinas de um mesmo fármaco podem apresentar diferentes propriedades o

que pode influenciar diretamente o processo de fabricação de um medicamento e, conseqüentemente modificar suas características físico-químicas (ARAÚJO, 2009).

Impurezas enantioméricas também recebem atenção em estudos farmacológicos, pois as vias sintéticas de fármacos quirais, em sua maioria, não são estereosseletivas, levando à formação de ambos os enantiômeros, devido às dificuldades técnicas e econômicas para separá-los. Por esses motivos, fármacos enantioméricos são quase sempre comercializados na forma de misturas racêmicas, ou seja, uma mistura de quantidades iguais de cada um dos enantiômeros (BERNARDO, 2008).

3.2.3 Legislação de impurezas

No Brasil, a resolução da diretoria colegiada (RDC) nº 57, de 17 de novembro de 2009 descreve a necessidade de caracterizar o perfil de impurezas como requisito para registro de insumos farmacêuticos ativos a serem comercializados no País, entretanto, nesta resolução não são estabelecidos limites (BRASIL, 2009). Além disso, a *International Conference on Harmonisation* (ICH) visando padronizar e regulamentar o perfil de impurezas presentes em formulações farmacêuticas instituiu três guias regulatórios referentes à análise de impurezas, sendo eles:

- ICH Q3A (R2) (2006)
 - Descreve as orientações sobre registro e qualificação do teor de impurezas presentes em novos fármacos produzidos por síntese química.
- ICH Q3B (R2) (2006)
 - Viabiliza orientações sobre registro e qualificação de impurezas presentes em novos medicamentos produzidos a partir de novos fármacos.
- ICH Q3C (R5) (2005)
 - Fornece limites aceitáveis para solventes residuais presentes em produtos farmacêuticos.

De uma forma geral o ICH Q3A (R2) prevê que para impurezas em novos produtos, a identificação não é necessária quando seu nível está abaixo de 0,1% a menos que as mesmas sejam tóxicas ou apresentem alguma atividade. Neste sentido, o ICH

Q3A (R2) preconiza os limites estabelecidos (Tabela 2) para impurezas em matérias-primas de novos fármacos produzidos por síntese química, conforme sua dose máxima diária.

TABELA 2 - Limites de impurezas relacionados ao relato, identificação ou qualificação de acordo com a dose administrada (ICH Q3A R2).

Dose máxima	Limite relatado*	Limite de identificação**	Limite de qualificação***
≤ 2 g/dia	0,05%	0,1% ou ingestão de 1,0 mg/dia	0,15% ou ingestão de 1,0 mg/dia
≥ 2 g/dia	0,03%	0,05%	0,05%

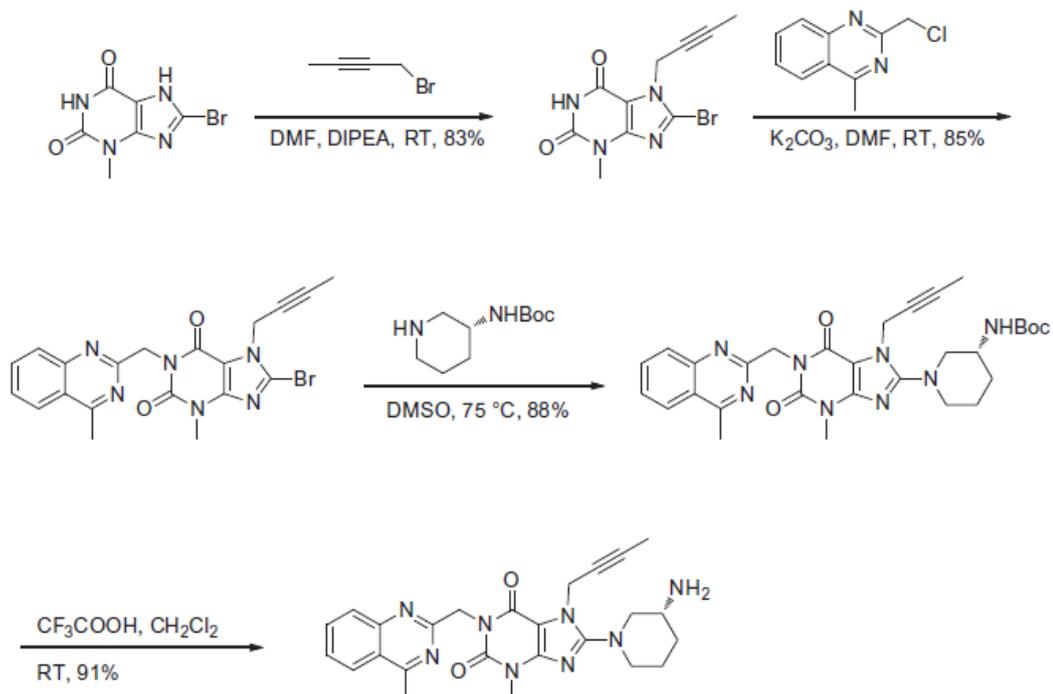
Legenda: *Um limite acima do indicado a impureza deve ser relatada; **Um limite acima do indicado a impureza que deve ser identificada; ***Um limite acima do indicado, a impureza deve ser qualificada.

3.2.4 Impurezas de síntese da linagliptina

As impurezas oriundas do processo de síntese são as principais impurezas orgânicas presente nos fármacos. Neste sentido, avaliando a rota sintética dos fármacos podemos observar quais são as prováveis impurezas presentes no produto final (NG; LUNN; FAUSTINO, 2007).

A Figura 2 apresenta a principal rota sintética do fármaco em estudo (DING, 2013).

FIGURA 2 - Rota de síntese da linagliptina



Legenda: Compostos químicos – DMF (Dimetilformamida), DIPEA (*N,N*-Diisopropylethylamine), RT (Fosfoetanolamina), K_2CO_3 (Carbonato de potássio) e DMSO (Dimetilsulfóxido)

Fonte: Ding, 2013

3.3 Validação de métodos analíticos para determinação de impurezas

O desenvolvimento de um método analítico ou adequação de um método já existente envolve um processo de avaliação de seus resultados, de modo a estimar sua eficiência. Esse processo de validação objetiva demonstrar que o método de escolha preenche as finalidades pretendidas, obtendo-se assim informações confiáveis para serem utilizadas (ERMER, 2005).

Neste sentido, a Farmacopeia Americana (United States Pharmacopeia - USP), a legislação brasileira através da resolução RE N° 899 (BRASIL, 2003) e o ICH apresentam Guias Regulatórios afim de uma melhor compreensão sobre os procedimentos analíticos e seus parâmetros. A resolução RE n° 899 (Brasil, 2003)

classifica estes testes em categorias de acordo com sua finalidade. A categoria I tem a finalidade de realizar testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas. Na categoria II realizar testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas. As categorias III e IV tem a finalidade de realizar testes de desempenho e identificação (BRASIL, 2003).

Estas diretrizes apresentam parâmetros para realizar a validação de uma metodologia entre eles: linearidade especificidade/seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e robustez. A tabela 3 apresenta os parâmetros que devem ser avaliados , dependendo da categoria dos ensaios (BRASIL, 2003).

TABELA 3 – Parâmetros avaliados para validação de métodos analíticos de acordo com a categoria do processo.

Parâmetro	Categoria I	Categoria II (Quantitativo)	Categoria II (Ensaio limite)	Categoria III	Categoria IV
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo	Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Repetibilidade					
Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

Fonte: Brasil, 2003

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária à comprovação da precisão.

3.4 Determinação quantitativa de gliptinas

A literatura pesquisada apresenta uma série de trabalhos publicados objetivando a determinação quantitativa de gliptinas utilizando diferentes métodos analíticos. El-Bagary; Elkady e Ayoub (2012) desenvolveram um trabalho utilizando a CLAE em fase reversa para determinação da LGT usando como fase móvel uma mistura de tampão fosfato pH 4,6 e acetonitrila (20:80, v/v) e vazão de 1,0 mL/min em eluente isocrático. A determinação quantitativa foi realizada utilizando dois diferentes detectores: ultravioleta a 299 nm e fluorescência a 239 nm para excitação e 355 nm para emissão.

Boovizhikannan e Palanirajan (2013) avaliaram a determinação de vildagliptina em sua forma pura e em comprimidos por CLAE em fase reversa. A fase móvel foi composta de uma mistura de tampão fosfato 0,1 mol/L e acetonitrila (85:15, v/v), coluna Agilent XDB C18 (150 mm x 4,6 mm x 5µm), vazão 1,0 mL/min. e comprimento de onda de detecção de 210 nm.

Archana; Sriram e Gayasuddin (2013) desenvolveram e validaram um método por CLAE para LGT em fase reversa, utilizando coluna Khromosil C18 (150 x 4,6 mm x 5µm), fase móvel constituída de uma mistura de 0,02 mol/L de di-hidrogenofosfato de potássio e acetonitrila (70:30 v/v) pH 5, ajustado com solução de ácido *o*-fosfórico 1%. A vazão utilizada foi 1,2 mL/min e comprimento de onda de 226 nm.

Sujatha e Rao (2013) desenvolveram uma metodologia por CLAE para determinação de LGT utilizando uma coluna C18 (100 x 4,6 mm x 5µm), fase móvel consistindo de tampão de fosfato (pH 3,4) e acetonitrila (70:30 v/v) em uma vazão de 1,0 mL/min. O fármaco foi detectado em 240 nm utilizando obteve detecção ultravioleta e apresentou 2,79 min. como tempo de retenção.

Engel (2014) desenvolveu um método por cromatografia líquida de fase reversa, indicativo de estabilidade do fármaco LGT em comprimidos, utilizando uma coluna C8 (100 x 4,6 mm x 5µm) em temperatura controlada de 30 °C, utilizando como fase móvel uma mistura de água (trietilamina 1,0%, ajustado para o pH 4,5 com ácido ortofosfórico) e de acetonitrila (80:20, v/v), vazão de 1,2 mL/min e detecção ultravioleta a 293nm.

3.5 Estudos de Segurança Biológica

De acordo com França (2008) qualquer substância química, dependendo das condições de exposição e/ou concentração, pode ser considerada tóxica, no entanto, qualquer substância, desde que as condições de exposição sejam mantidas abaixo dos níveis de tolerância, pode ser usada de forma segura. Neste sentido, a compreensão das propriedades físicas e químicas dos compostos químicos, bem como de seus efeitos sobre as células, genes e mutações constituem importantes informações para se avaliar o

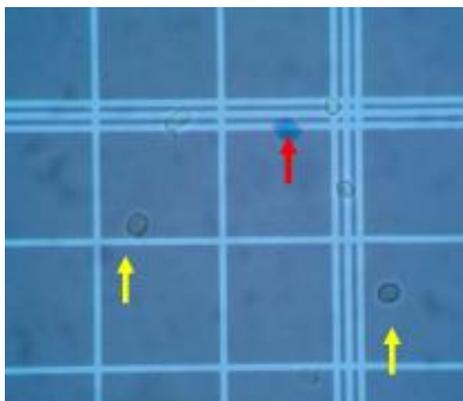
comprometimento deletério ou mesmo a potencialidade de ação letal que um determinado produto exerce sobre os organismos.

3.5.1 Citotoxicidade

A morte celular é uma consequência de um processo irreversível causado por uma injúria celular letal. Esta pode ocorrer através de dois mecanismos, necrose ou apoptose, os quais diferem pelas vias bioquímicas e expressão morfológica. Agentes tóxicos podem induzir ou alterar a taxa de apoptose, neste sentido, a avaliação da taxa de morte celular induzida torna-se imprescindível para avaliar a capacidade toxicológica de uma substância (PETINARI, 2004). A avaliação da citotoxicidade pode ser feita através da análise da observação da integridade da membrana celular utilizando métodos com corantes, morfologia celular ou proliferação celular.

Entre as técnicas utilizadas para avaliar a citotoxicidade, a análise da viabilidade celular se destaca. Esta técnica é realizada através da observação de alterações morfológicas e contagem das células em um microscópio. Na visualização celular as células viáveis possuem aspecto translúcido e as células mortas apresentam coloração azulada à arroxeadada, conforme a figura 3 (VALADERES, 2007).

FIGURA 3 – Teste de viabilidade celular utilizando azul de tripan. Obs.: as setas amarelas indicam células viáveis e a seta vermelha indica célula não viável.



Fonte: Alves, 2009

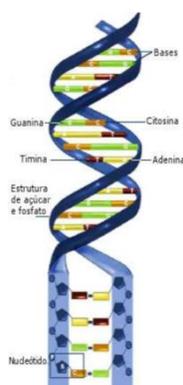
3.5.2 Genotoxicidade

A genotoxicidade é uma técnica que estuda os processos que alteram a base genética da vida por meio de, sua estrutura físico-química, o ácido desoxirribonucleico (DNA), ou ainda por alteração do determinismo genético a níveis orgânicos e celulares, identificados, respectivamente, como teratogênese e carcinogênese (SAMPAIO, 2012).

3.5.2.1 Molécula de DNA

O DNA é uma macromolécula biológica que tem como função conter e armazenar as informações genéticas. É formado por duas cadeias helicoidais que se enrolam ao redor do mesmo eixo formando uma dupla hélice. A molécula de DNA (figura 4) é constituída por uma sequência de nucleotídeos, formados por três diferentes tipos de moléculas: um grupo fosfato; um açúcar pentose e uma base nitrogenada. Estas bases nitrogenadas são derivadas de compostos heterocíclicos chamados de pirimidinas, sendo representadas pela citosina e timina (C e T) e as purinas, representadas adenina e guanina (A e G). A quantidade total de nucleotídeos purínicos (A + G) é sempre igual à quantidade total de nucleotídeos pirimidínicos (T + C), sendo que a quantidade de A sempre igual à quantidade de T e a quantidade de G sempre igual à quantidade de C, mas a quantidade de (A + T) não é necessariamente igual à quantidade de (G + C), pois esta proporção varia entre organismos diferentes (SCHERER, 2013).

FIGURA 4 – Estrutura do DNA



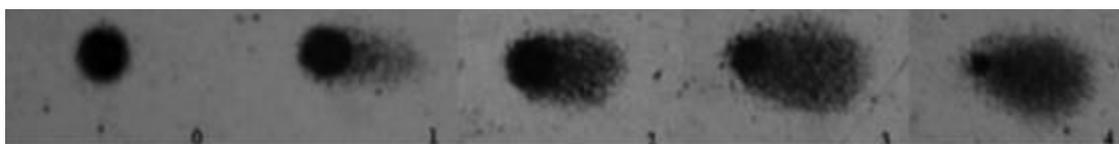
Fonte: Lopez, 2015

3.5.2.2 Danos e reparo de DNA

Os danos no DNA normalmente são quebras em uma fita ou ambas fitas de DNA, ligações cruzadas das bases entre si ou entre proteínas da fita e/ou através de adição de compostos às bases do DNA. Assim, um pequeno número de mutações em genes específicos pode acarretar em um crescimento desordenado das células, levando ao início de um processo neoplásico. Após o dano, a célula pode entrar em apoptose, eliminando a célula que tenha o processo danoso por completo, ou reparar o dano de forma que sua estrutura molecular retorne ao seu estado inicial (HOFFMANN E PRESTON, 2012).

Algumas técnicas para detecção de danos no DNA têm sido utilizadas para identificar substâncias com atividade genotóxica, entre elas o teste cometa, o qual não é empregado para detectar mutações, mas sim lesões gênicas que, após processadas, podem resultar em mutações. Este teste tem como princípio básico a migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas, que por fim pode ser observado, com ajuda de um microscópio, o grau de lesão no DNA, classificados de 0 à 4. O valor 0 significa sem migração e o valor 4 migração máxima, as células têm a aparência de um cometa, com cabeça (região nuclear) e uma cauda com os fragmentos de DNA que migraram em direção ao pólo positivo (figura 5) (SAMPAIO, 2013).

FIGURA 5 – Classificação dos nucleóides conforme o comprimento da cauda, pontuação de 0 (sem migração) a 4 (migração máxima).



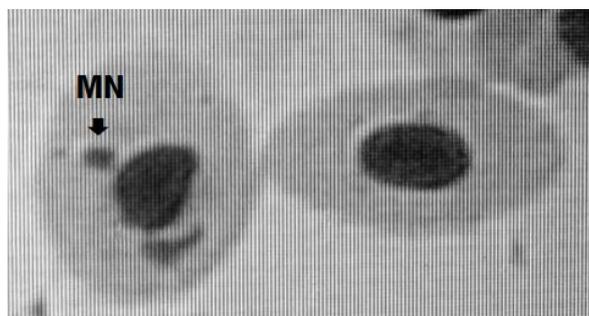
Fonte: Lopez, 2015

3.5.3 Mutagenicidade

As mutações geralmente são induzidas por agentes químicos, físicos ou biológicos, os quais afetam processos como a transcrição, duplicação gênica e alterações cromossômicas. Estas mutações ocorrem quando as lesões no DNA se fixam de forma capaz de ser transmitida a novas gerações de células, o que pode ocorrer em qualquer célula e em qualquer estágio do ciclo celular, causando deleção parcial ou completa de um gene (POLETTI, 2011; LOPEZ, 2015).

A técnica de escolha utilizada para a avaliação das lesões que causam mutações é a de micronúcleos, a qual avalia a formação de um núcleo adicional formado por cromossomos ou fragmentos de cromossomos que não são incluídos no núcleo principal durante a mitose (SCHMID, 1975; CARRARD, 2007). Esta técnica se faz com auxílio de microscopia, onde é realizada a visualização de células mononucleadas com presença de um, dois ou três micronúcleos (figura 6).

FIGURA 6 – Célula com presença de micronúcleos (MN)



Fonte: Bucher, 2006

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Produto farmacêutico e substâncias químicas de referência

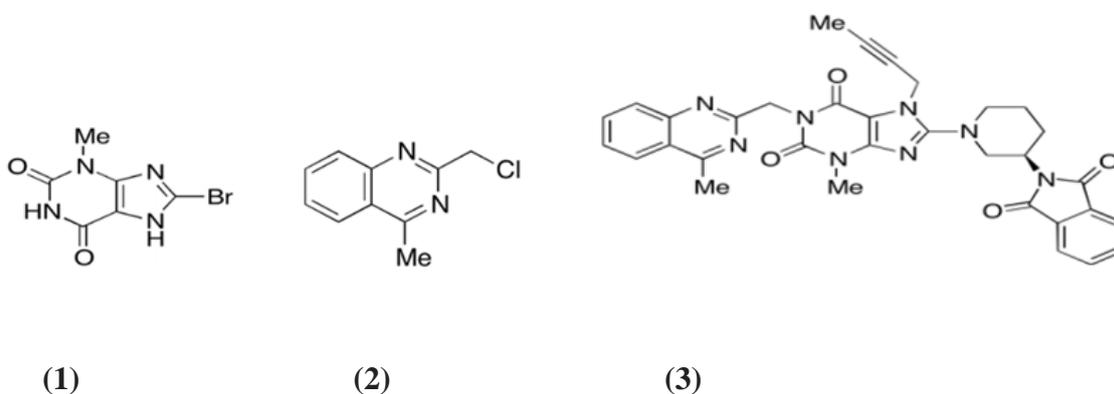
Produto farmacêutico (LGT-FA): Amostras comerciais do medicamento TRAYENTA[®], produzido pela Boehringer Ingelheim, contendo 5 mg de LGT em comprimidos revestidos, lote 460464AA com validade de 06/14-06/16.

Substância química de referência - Linagliptina (SQR-LGT): Adquirida junto à empresa Sequoia Research Products (Pangbourne, Reino Unido), com pureza de 99,4%.

Substância química de referência – Impureza (SQR-IMP): Adquiridas junto à empresa Sequoia Research Products (Pangbourne, Reino Unido), sendo as três denominadas (1), (2) e (3) (Figura 7).

- (1) 8-Bromo-3,9-dihidro-3-metil-1H-purine-2,6-dione (CAS: 93703-24-3);
- (2) 2-(Chloromethyl)-4-methylquinazoline (CAS: 109113-72-6);
- (3) 7-(2-Butynyl)-8-[(3R)-3-(1,3-dihidro-1,3-dioxo-2H-isoindol-2-yl)-1-piperidinyl]-3,7-dihidro-3-metil-1-[(4-metil-2-quinazoliny)metil]-1H-purine-2,6-dione; R-7-(But-2-yn-1-yl)-8-(3-(1,3-dioxoisoindolin-2-yl)piperidin-1-yl)-3-metil-1-((4-metilquinazolin-2-yl)metil)-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione (CAS: 886588-63-2);

FIGURA 7 – Impurezas de síntese da linagliptina



Legenda: (1) Impureza 1; (2) Impureza 2; (3) Impureza 3

Fonte: Ding, 2013

4.2 Solventes e reagentes

- Acetonitrila grau CLAE - Tédia® (Rio de Janeiro, Brasil)
- Ácido clorídrico P.A. - Proquímios® (Rio de Janeiro, Brasil)
- Ácido fórmico P.A. - Vetec® (Duque de Caxias, RJ, Brasil)
- Água ultrapura obtida a partir do equipamento - Elga® (High Wycombe, Reino Unido)
- Hidróxido de amônio P.A. - Proquímios® (Rio de Janeiro, Brasil)
- Hidróxido de sódio P.A. - Dinâmica® (Diadema, SP, Brasil)
- Metanol grau CLAE - Proquímios® (Rio de Janeiro, Brasil)
- Peróxido de hidrogênio P.A. - Dinâmica® (Diadema, SP, Brasil)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) P.A. – Vetec® (Duque de Caxias, RJ, Brasil)

4.3 Equipamentos

- Balança - Shimadzu® (Kyoto, Japão)
- Estufa - Biofoco® (Piracicaba, SP, Brasil)
- Cromatógrafo a líquido de alta eficiência provido de bombas quaternária, injetor automático e detector de arranjo de fotodiodos (DAD) da Thermo Scientific Dionex Ultimate® 3000 acoplado ao software - Chromeleon 6.8 (Waltham, Estados Unidos)
- Coluna - Thermo scientific® C8 (5 µm - 4,6 x 100 mm) (Waltham, Estados Unidos)
- Capela - Quimis® (Diadema, SP, Brasil)
- Lavadora Ultrassônica - Unique® (Indaiatuba, SP, Brasil)
- Sistema de purificação de água - Elga® (High Wycombe, Reino Unido)
- Estufa de CO₂ - Panasonic® (Wakayama, Japão)
- Microscópio biológico - Olympios® (Tokyo, Japão)
- Cuba de eletroforese horizontal - Eximlab® (São Paulo, SP, Brasil)
- Fonte de eletroforese - Loccus biotecnologia® (São Paulo, SP, Brasil)

4.4 Metodologia

4.4.1 Desenvolvimento e validação do método analítico

O desenvolvimento e a validação do método indicativo de estabilidade foram realizados por CLAE-DAD de acordo com as diretrizes estabelecidas na RDC nº 899 de 29 de maio de 2003 (BRASIL, 2003) e o ICH (2005).

4.4.1.1 Preparo das soluções estoque

4.4.1.1.1 Preparo da solução estoque de Linagliptina-Fármaco (LGT-FA)

Vinte comprimidos de linagliptina foram pesados individualmente para obter seu peso médio e, posteriormente os comprimidos foram triturados em um gral e acondicionados em frasco âmbar.

Para a preparação da solução estoque foram pesados o equivalente a 20 mg de LGT (0,7383 g do peso médio), transferidos para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de 50,0 mL de metanol, ultrassonicado por 20 minutos e completado o volume com metanol. Após, foi realizada uma filtração com o sistema de filtro a vácuo para fase móvel utilizando uma membrana de 0,45 µm. Com isto, obteve uma solução na concentração de 200,0 µg/mL de LGT. Esta solução foi armazenada em frasco âmbar sob refrigeração a 8 °C.

4.4.1.1.2 Preparo da solução estoque de Linagliptina - substância química de referência (LGT-SQR)

Foram preparadas duas soluções de LGT-SQR, denominadas solução 1 e 2-LGT-SQR. Para preparo de solução 1-LGT-SQR foi pesado 5 mg de LGT-SQR, transferidos para balão volumétrico de 25 mL com auxílio de 5 mL de metanol, ultrassonicado por 20 minutos e completado o volume com metanol, obtendo-se uma solução na concentração de 200,0 µg/mL. Para preparar a solução estoque 2-LGT-SQR foram realizados os mesmos procedimentos que a solução 1 alterando apenas o balão

volumétrico utilizado (10 mL) para obter uma concentração final de 500,0 µg/mL. Ambas foram armazenadas em frasco âmbar sob refrigeração à 8 °C.

4.4.1.1.3 Preparo da solução estoque das impurezas farmacêuticas

Para a preparação da solução estoque 1-IMP, foram pesadas 20 mg de cada impureza (1, 2 e 3), transferidas para balão volumétrico de 100 ml com auxílio de 15,0 ml de metanol, ultrassonicadas por 20 minutos e o volume completado com o mesmo solvente, de modo a obter soluções na concentração de 200,0 µg/mL de cada impureza.

Para a preparação da solução estoque 2-IMP e 3-IMP, foram adicionados 10,0 e 1,0 mL da solução estoque 1 em um balão volumétrico de 100 e 25 mL e completado o volume com metanol, para obter as concentrações finais de 20,0 e 8,0 µg/mL, respectivamente. Após, foi preparado a solução 4-IMP, onde foram adicionados 25,0 mL da solução estoque 2-IMP num balão volumétrico de 100 mL e completado o volume com metanol, para obter uma concentração final de 5,0 µg/mL. Todas as soluções foram armazenadas separadamente em frascos âmbar sob refrigeração à 8 °C.

4.4.1.1.4 Preparo da solução estoque do placebo

Os excipientes farmacêuticos dos comprimidos de LGT de 5 mg foram obtidos utilizando o informe técnico (bula) de referência Trayenta[®]. A formulação encontra-se na tabela 4.

TABELA 4 - Excipientes farmacêuticos presentes no medicamento Trayenta®, com suas respectivas funções, faixas percentuais utilizadas na produção de comprimidos e porcentagem utilizada para preparação do placebo.

Excipientes	Funções nos comprimidos	Faixa utilizada	% utilizada
Manitol	Diluyente	10 - 90%	81,3% **
Amido pregelatinizado e Amido	Agente de compressão (aglutinante)	5 - 15%	10% **
Copovidona	Agente de compressão e formador de filme em revestimentos	2,0 - 5,0%	4% **
Estearato de magnésio	Lubrificante	0,25 - 5%	1% **
Opadry® Rosa*	Agente de revestimento	0,25 - 2%	1% **

*Opadry® Rosa: hipromelose (revestimento), dióxido de titânio (pigmento), talco (diluyente), macrogol (agente solubilizante) e óxido férrico vermelho (pigmento).

**considerando a LGT correspondendo a 2,7%.

Fonte: Rowe; Sheskey; Quinn, 2009

Para a preparação da solução estoque foram pesados os excipientes conforme a porcentagem da tabela 4. Transferiu-se os excipientes para balão volumétrico de 25 ml com auxílio de 15,0 ml de metanol, ultrassonicou-se por 20 minutos e completou-se o volume com o mesmo solvente. Filtrou-se e armazenou-se a solução em frasco âmbar sob refrigeração à 8 °C.

4.4.1.1.5 Preparo da solução de trabalho de Linagliptina-substância química de referência e impurezas (LGT-SQR-IMP)

Para o preparo da solução de trabalho SQR-IMP foi transferido 2,4 mL da solução 2 LGT-SQR (500,0 µg/mL) e 225 µL de cada impureza da solução estoque 3-IMP (8,0 µg/mL), para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com metanol. Obteve-se uma concentração final de 120,0 µg/mL e 0,180 µg/mL para LGT e cada impureza, respectivamente.

4.4.1.1.6 Preparo da solução de trabalho Linagliptina-fármaco e impurezas (LGT-FA-IMP)

Para o preparo da solução LGT-FA-IMP pesou-se o equivalente a 1,2 mg de LGT-FA e transferiu-se para balão volumétrico de 10 ml, adicionou 225 µL de cada impureza (solução estoque 3-IMP), ultrassonicou e completou o volume com metanol, obtendo as concentrações finais de 120,0 µg/mL e 0,180 µg/mL para a LGT e cada impureza, respectivamente.

4.4.1.2 Condições cromatográficas

Todas as soluções preparadas foram filtradas com membrana de 0,22 micra de polivinidileno (pvdf) antes de serem injetadas no cromatógrafo a líquido. As condições cromatográficas testadas estão descritas na tabela 5.

TABELA 5 – Condições cromatográficas testadas no modo de eluição isocrático

Fase móvel	Coluna
Ácido fórmico 0,1% pH 3,5 / metanol (35:65)	C18 (5 µm - 4,6x100 mm)
Ácido fórmico 0,1% pH 3,5 / ACN / metanol (40:30:30)	C18 (5 µm - 4,6x100 mm)
Ácido fórmico 0,1% pH 3,5 / ACN (40:60)	C18 (5 µm - 4,6x100mm)
Ácido fórmico 0,1% pH 3,5 / ACN / metanol (40:20:20)	C8 (5 µm - 4,6x150 mm)
Ácido fórmico 0,1% pH 3,5 / ACN (70:30)	C8 (5 µm - 4,6x150 mm)
Ácido fórmico 0,1% pH 3,5 / ACN (50:50)	C8 (5 µm - 4,6x150 mm)
Ácido fórmico 0,1% pH 3,5 / ACN (40:60)	C8 (5 µm - 4,6x150 mm)

Legenda: ACN: Acetonitrila; Ácido fórmico 0,1% pH 3,5: solução de ácido fórmico 0,1% (pH 3,5 ajustado com hidróxido de amônio).

4.4.1.3 Validação do método analítico

A validação do método analítico foi realizada de acordo com a RE 899/2003 (BRASIL, 2003) e o ICH (2005) por meio da análise dos seguintes parâmetros

analíticos: especificidade e seletividade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação. Estas análises objetivaram a detecção e a quantificação do fármaco e de suas principais impurezas de síntese.

4.4.1.3.1 Seletividade e Especificidade

A seletividade do método analítico foi avaliada por meio da verificação da interferência dos excipientes da formulação dos comprimidos e dos produtos de degradação formados em condições de estresse na determinação quantitativa do fármaco e de suas principais impurezas de síntese nos comprimidos. Durante os estudos o pó triturado dos comprimidos de linagliptina em solução foi submetido a diferentes condições de estresse: hidrólise ácida/básica, oxidação, fotodegradação, hidrólise ácida/básica com adição de temperatura. Nestas condições de trabalho, objetivou-se a degradação entre 5 a 20% do fármaco, evitando uma degradação muito drástica e, com isto, a própria degradação dos produtos de degradação intermediários (ALSANTE et al., 2007). Os ensaios foram realizados em triplicata em cada condição de degradação.

Em todas as condições de degradação foi realizada a quantificação do fármaco nos comprimidos para utilização como teor no tempo zero.

4.4.1.3.1.1 Degradação em meio ácido

A hidrólise ácida foi realizada através da adição de 1,0 mL da solução estoque de LGT-FA (200 µg/mL) e 2,0 mL de HCl 1,0 mol/L em balões volumétrico de 10 mL, os quais foram deixados em repouso por 24 e 48 horas. Após cada tempo foram adicionados 2,0 mL de NaOH 1,0 mol/L para neutralização, 180 µL da solução estoque 1-IMP de cada impureza e completado o volume com metanol, de modo a obter a concentração de 20,0 µg/mL de LGT e 3,60 µg/mL de cada impureza.

4.4.1.3.1.2 Degradação em meio alcalino

A hidrólise básica foi realizada através da adição de 1,0 mL da solução estoque de LGT-FA (200 µg/mL) e 2,0 mL de NaOH 1,0 mol/L em balões volumétrico de 10 mL e deixados em repouso por 24 e 48 horas. Após cada tempo equivalente foram

adicionados 2,0 mL de HCl 1,0 mol/L para neutralização, 180 µL da solução estoque 1-IMP de cada impureza e completado o volume com metanol, de modo a obter a concentração de 20,0 µg/mL de LGT e 3,6 µg/mL de cada impureza.

4.4.1.3.1.3 Degradação térmica

A degradação térmica foi realizada através da adição de 5,0 mL da solução estoque de LGT-FA (200 µg/mL) em frascos de 10 mL e mantidos em estufa sob aquecimento de 60 °C por 1, 2 e 3 horas. Após cada tempo equivalente foi transferido o volume total dos frascos para balões volumétricos de 50 mL, adicionados 180 µL da solução estoque 1-IMP de cada impureza e completado o volume com metanol, de modo a obter a concentração de 20,0 µg/mL de LGT e 3,6 µg/mL de cada impureza.

4.4.1.3.1.4 Degradação ácida térmica

A degradação ácida térmica foi realizada através da adição de 5,0 mL da solução estoque de LGT-FA (200 µg/mL) e 10,0 mL de HCl 1,0 mol/L em frascos de 50 mL e mantidos em estufa sob aquecimento de 80 °C por 2, 4, 6 e 10 horas. Após cada tempo equivalente foi transferido o volume total dos frascos para balões volumétricos de 50 mL, adicionados 10,0 mL de NaOH 1,0 mol/L, 180 µL da solução estoque 1-IMP de cada impureza e completado o volume com metanol, de modo a obter a concentração de 20,0 µg/mL de LGT e 3,6 µg/mL de cada impureza.

4.4.1.3.1.5 Degradação básica térmica

A degradação básica térmica foi realizada através da adição de 5,0 mL da solução estoque de LGT-FA (200 µg/mL) e 10,0 mL de NaOH 1,0 mol/L em frascos de 50 mL e mantidos em estufa sob aquecimento de 80 °C por 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Após cada tempo equivalente foi transferido o volume total dos frascos para balões volumétricos de 50 mL, adicionados 10,0 mL de HCl 1,0 mol/L, 180 µL da

solução estoque 1-IMP de cada impureza e completado o volume com metanol, de modo a obter a concentração de 20,0 µg/mL de LGT e 3,6 µg/mL de cada impureza.

4.4.1.3.1.6 Degradação oxidativa (H₂O₂ 30%)

A degradação oxidativa foi realizada através da adição de 1,0 mL da solução estoque de LGT-FA (200 µg/mL) e 2,0 mL de peróxido de hidrogênio 30% em balões volumétrico de 10 mL e deixados em repouso por 2, 4, 6 e 10 horas. Após cada tempo equivalente foram adicionados 180 µL da solução estoque 1-IMP de cada impureza e completado o volume com metanol, de modo a obter a concentração de 20,0 µg/mL de LGT e 3,6 µg/mL de cada impureza.

4.4.1.3.1.7 Degradação fotolítica ultravioleta A (UV-A)

A degradação fotolítica UV-A foi realizada através da adição de 1,0 mL da solução estoque de LGT-FA (200 µg/mL) em cubetas descartáveis Plastibrand® e submetidas à radiação UV-A por 1, 2, 3 e 6 horas em câmara de fotoestabilidade. Após cada tempo equivalente foi transferido o volume total das cubetas para balões volumétricos de 10 mL, adicionados 180 µL da solução estoque 1-IMP de cada impureza e completado o volume com metanol, de modo a obter a concentração de 20,0 µg/mL de LGT e 3,6 µg/mL de cada impureza.

4.4.1.3.2 Linearidade

A avaliação da linearidade do método analítico foi realizada por meio da análise da variância (ANOVA), do cálculo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e do coeficiente de correlação para a LGT-SQR e para impurezas de síntese.

4.4.1.3.2.1 Linearidade da LGT-SQR

Para obtenção da curva padrão, pesou-se 7,2 mg de LGT-SQR, transferiu-se para um balão volumétrico de 25 mL com auxílio de 15,0 ml de metanol e ultrassonicou-se. Completou-se o volume com o mesmo solvente, de modo a obter solução a 288,0 µg/mL de LGT. Desta solução, foram preparadas soluções para obter concentrações de 2,41, 4,03, 6,71, 11,19 e 144,0 µg/mL, as quais foram diluídas em uma mistura de metanol e ácido fórmico 0,1% (v/v) (50:50 v/v).

4.4.1.3.2.2 Linearidade das impurezas

Para obtenção da curva padrão, transferiu-se 900,0 µL da solução estoque 1-IMP para um balão volumétrico de 25 mL com auxílio de 15,0 ml de metanol e ultrassonicou-se. Completou-se o volume com o mesmo solvente, de modo a obter solução a 7,20 µg/mL de cada impureza. Desta solução, foram preparadas soluções para obter concentrações de 0,060, 0,100, 0,167, 2,16 e 3,60 µg/mL, as quais foram diluídas em uma mistura de metanol e ácido fórmico 0,1% (v/v) (50:50 v/v). A faixa de concentração foi determinada pelos limites estabelecidos no guia regulatório ICH Q3A (R2) (ICH, 2006).

4.4.1.3.3 Precisão

A precisão do método analítico foi realizada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária, as quais foram avaliadas por meio da determinação do desvio padrão relativas (DPR) das determinações quantitativas.

Para análise da precisão intradia foi pesado o equivalente a 0,60 mg de LGT (0,0221 g), transferidos para balão volumétrico de 5,0 mL com auxílio de 2 mL de metanol e adicionou-se 180 µL da solução estoque 4-IMP de cada impureza. Ultrassonicou-se, completou o volume com a mistura de metanol e ácido fórmico 0,1% v/v (50:50 v/v) e filtrou-se. Ao final obteve-se uma concentração de 120,0 µg/mL de LGT e 0,180 µg/mL de cada impureza. Estes procedimentos foram realizados em

sextuplicata. Para análise de precisão interdia foram realizados os procedimentos da precisão intradia em três dias consecutivos e por dois analistas.

4.4.1.3.4 Exatidão

A exatidão do método analítico foi realizada a partir do método de adição de LGT-SQR e impurezas em amostras de LGT-FA para posterior determinação do percentual de recuperação. Após esta adição, os valores foram comparados com amostras de LGT-SQR e impurezas nas mesmas concentrações. As preparações foram realizadas em um balão volumétrico de 5,0 mL e em triplicata conforme demonstrado na tabela 6.

TABELA 6 - Preparo das soluções para avaliação da exatidão pelo método de adição de padrão (LGT-SQR)

Amostra	Peso de LGT-FA (g)	Volume da solução de LGT-SQR* (μL)	Volume da solução das impurezas** (μL)	Concentração de LGT (μg/mL)	Concentração de IMP (μg/mL)
A	0,0221***	-	-	120	-
AA1	0,0221***	60	120	126	0,120
AA2	0,0221***	120	300	132	0,300
AA3	0,0221***	240	600	144	0,600
P	-	1200	-	120	-
P1	-	1260	120	126	0,120
P2	-	1320	300	132	0,300
P3	-	1440	600	144	0,600

*Volume adicionado da solução estoque 2-LGT-SQR (500,0 μ g/mL); **Volume adicionado de cada impureza da solução estoque 4-IMP (5,0 μ g/mL); ***0,0221 g é equivalente a 0,6 mg de linagliptina (120,0 μ g/mL).

Legenda: A: amostra; AA1: amostra adicionada 1; AA2: amostra adicionada 2; AA3: amostra adicionada 3; P: padrão; P1: padrão adicionado 1; P2: padrão adicionado 2; P3: padrão adicionado 3; LGT-SQR: linagliptina-substância química de referência.

4.4.1.3.5 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificado, sob as condições indicadas do teste. O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser quantificada com precisão e exatidão em níveis aceitáveis sob as condições estabelecidas do teste (BRASIL, 2003; FDA, 1994; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2007). De acordo com Brasil RE 899 (BRASIL, 2003) o LD pode ser estabelecido pela concentração que gera um sinal três vezes maior do que ruído da linha de base e o LQ pela concentração que corresponde a dez vezes o sinal ruído (S/R).

O sinal ruído da fase móvel foi determinado a partir da injeção de uma solução branco contendo uma mistura de metanol e ácido fórmico 0,1% v/v (50:50 v/v), observado por um tempo equivalente a 20 vezes a largura à meia altura dos picos de linagliptina e das impurezas de síntese em suas respectivas concentrações de trabalho (120,0 e 0,180 µg/mL para LGT e cada impureza, respectivamente). Os ensaios foram realizados em sextuplicata.

4.4.1.3.6 Robustez

A robustez foi avaliada para determinar a capacidade do método de resistir a pequenas variações realizadas nas condições cromatográficas. Os parâmetros utilizados e fatores alterados estão apresentados na tabela 7.

TABELA 7 - Fatores e níveis utilizados na avaliação da robustez do método analítico

Fatores	(-)	Nominal	(+)
pH da fase móvel	3,3	3,5	3,7
Temperatura do forno da coluna	25 °C	30 °C	35 °C
Vazão	0,57 mL/min.	0,6 mL/min.	0,63 mL/min.
Detector – λ LGT	291 nm	294 nm	297 nm
Detector – λ IMP1	275 nm	278 nm	281 nm
Detector – λ IMP2	265 nm	268 nm	271 nm
Detector – λ IMP3	277 nm	280 nm	283 nm

Legenda: LGT: linagliptina; IMP1: impureza 1; IMP2: impureza 2; IMP3: impureza 3.

A avaliação dos resultados foi realizada a partir da aplicação do teste T de Student comparando o percentual médio da concentração dos analitos em cada parâmetro com o percentual médio da concentração dos analitos nas condições cromatográficas nominais.

4.4.1.4 Avaliação da cinética de degradação da solução de LGT nos comprimidos em condições alcalinas em presença de temperatura (NaOH 1,0 mol/L a 80 °C)

A avaliação da cinética de degradação do fármaco LGT nos comprimidos foi realizada de acordo com o descrito no item 4.4.1.3.1.5.

4.4.1.4.1 Definição da ordem de reação

A ordem de reação foi definida através dos resultados de concentração de LGT, obtidos em cada tempo de exposição, para construção dos gráficos de:

- Tempo de exposição à condição de degradação (min.) *versus* concentração ($\mu\text{g/ml}$) para ordem zero;
- Tempo de exposição à condição de degradação (min.) *versus* logaritmo natural (\ln) da concentração ($\mu\text{g/ml}$) para primeira ordem;

- Tempo de exposição à condição de degradação (min.) *versus* 1/concentração ($\mu\text{g/ml}$) para segunda ordem.

Após a determinação da ordem de reação foram calculadas as constantes de decaimento (k), $T_{90\%}$ e tempo de meia vida ($T_{1/2}$).

4.4.2 Análise da segurança biológica

4.4.2.1 Obtenção da matriz sanguínea

Para se obter a matriz sanguínea foi realizada uma coleta de um doador(a) voluntário(a) adulto(a), não fumante, maior de 18 anos e que, nas últimas 72 horas que antecederam à coleta, não tenha consumido bebida alcoólica ou medicamento. O local da coleta de sangue foi nas dependências do Laboratório de Imunologia do Campus de Uruguaiana e os(as) doadores(as) receberam o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). A coleta da matriz biológica (leucócitos humanos para a utilizados nas culturas) para o estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Maria, sob a Carta de aprovação número 23.081.

4.4.2.2 Preparo da solução de linagliptina-substância química de referência

Pesou-se 19,6 mg de LGT (SQR), transferiu-se para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de 60 mL de PBS e colocou-se em ultrassom por 20 minutos. Adicionou-se 1,5 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), colocou novamente no ultrassom por mais 20 minutos e completou-se o volume com PBS, obtendo-se uma concentração de 196,0 $\mu\text{g/mL}$ de LGT. A partir desta solução realizou-se diluições sucessivas até a concentração de 0,393 $\mu\text{g/mL}$ de LGT na solução estoque.

4.4.2.3 Preparo das impurezas 1, 2 e 3

Pesou-se 39,3 mg de cada impureza, transferiu-se separadamente para balões volumétricos de 1000 mL com auxílio de 500,0 mL de PBS e colocou-se em ultrassom por 20 minutos. Adicionou-se 5,0 mL de DMSO, colocou-se novamente no ultrassom

por mais 20 minutos e completou-se o volume com PBS, para obter uma concentração de 39,3 µg/mL de cada impureza. A partir desta solução realizaram-se diluições sucessivas até a concentração 0,00393 µg/mL de cada impureza na solução estoque.

4.4.2.4 Preparo da Cultura de Leucócitos Humanos

As culturas de leucócitos foram preparadas utilizando 4,2 mL de sangue venoso coletado por venopunção de voluntários. O sangue foi imediatamente transferido para o meio de cultura contendo 63,0 mL de meio RPMI 1640, suplementado com 25% de soro fetal bovino e 1% de estreptomicina/penicilina (SANTOS MONTAGNER et al., 2010). Os frascos de cultura celular foram colocados em estufa a 37 °C em ambiente de CO₂ por 72 horas.

4.4.2.5 Tratamento da cultura de leucócitos

Todos os grupos de cultura foram testados em triplicata e receberam a adição das amostras (LGT e IMPs) nas concentrações mostradas na tabela 8. Os grupos testados foram: controle negativo (CN) com 500 µL de tampão PBS 7,4, controle positivo (CP) com 100 µM de peróxido de hidrogênio e amostras de LGT, impureza 1, impureza 2 e impureza 3. As concentrações de trabalho escolhidas foram baseadas nas concentrações plasmáticas do fármaco LGT, descritas por Neumiller e Setter (2012).

TABELA 8 - Concentrações da linagliptina e impurezas 1, 2 e 3 que foram usadas no tratamento das culturas de leucócitos humanos

	10x [] PP (ng/mL)	[] PP (ng/mL)	10% [] PP (ng/mL)
Linagliptina	39,3	3,93	0,393
Impureza 1	0,393	0,0393	0,00393
Impureza 2	0,393	0,0393	0,00393
Impureza 3	0,393	0,0393	0,00393

Legenda: [] PP (concentração no pico plasmático)

4.4.2.6 Avaliação dos parâmetros citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em cultura de leucócitos humanos

Para avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade das substâncias estudadas foram realizados testes de viabilidade celular, teste cometa e frequência de micronúcleos, respectivamente.

4.4.2.6.1 Viabilidade celular (teste com Azul de Tripán)

A viabilidade foi avaliada por meio do teste de diferenciação da integridade da membrana leucocitária utilizando o método de Azul de Tripán, onde se podem diferenciar células normais ou íntegras de células inviáveis (coradas de azul) (BUROW et al., 1998).

Para a realização desta técnica foi preparada uma solução de Azul de Tripán 0,2% (p/V) e misturadas com alíquotas provenientes das culturas de linfócitos. Após, foram visualizadas e contabilizadas com auxílio da câmara de Neubauer em um microscópio em aumento de 400x. A diferenciação entre células viáveis e inviáveis foi realizada por meio da observação da coloração azul nas células inviáveis.

4.4.2.6.2 Teste de Micronúcleo

O teste de micronúcleo foi realizado segundo a técnica descrita por Schmid (1975), onde, as lâminas foram analisadas em microscópio em um aumento de 1000x e classificadas como: células mononucleadas com presença de um, dois ou três micronúcleos, além de células em processo de necrose e/ou células em processo de apoptose. Os resultados dos testes são exibidos como Índice de Divisão Nuclear (IDN), calculado de acordo com Fenech (2000).

4.4.2.6.3 Teste cometa

A análise foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Singh (1988). No ensaio foram utilizadas lâminas previamente cobertas com agarose (15 g de agarose dissolvidas em 20,0 mL de PBS e aquecidas até 300 °C por 3 vezes), as quais foram secas por 24 horas em temperatura ambiente. No dia seguinte, foi adicionado alíquotas do precipitado da cultura celular às lâminas e incubadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10,0 com 1% Triton X-100 e 10% DMSO) por 7 dias. Posteriormente, as lâminas foram submetidas à eletroforese (20 min a 300 mA e 25 V) em tampão hidróxido de sódio 300 mM e pH > 13. Ao final da eletroforese, as lâminas foram neutralizadas e submetidas à secagem em temperatura ambiente. As lâminas secas foram fixadas, secas novamente, reidratadas e coradas com nitrato de prata. Os danos no DNA foram classificados utilizando o índice dos danos (ID), avaliados a partir da migração das proteínas do DNA, que pode variar da pontuação de 0 (sem migração, não há dano) até 4 (migração máxima, dano máximo). O dano ao DNA foi calculado a partir das células com diferentes classificações de danos; o índice de dano varia de 0 (100 células x 0 quando não ocorreu dano) a 400 (100 células x 4, quando ocorreu o máximo de dano).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Validação do método analítico da determinação de linagliptina e impurezas por CLAE

5.1.1 Otimização do método cromatográfico

Durante o desenvolvimento do método cromatográfico para detecção e quantificação da LGT e impurezas de síntese foram testadas diferentes condições analíticas. Primeiramente, empregaram-se colunas de fase reversa C8 e C18, entretanto, devido às características físico-químicas da LGT os melhores resultados foram obtidos utilizando a coluna C8 (5µm, 4,6x150mm). Kavitha et al. (2013) e Engel (2014) ao realizar a determinação de LGT também utilizaram a coluna de separação C8 como fase estacionária de escolha, no entanto, estes autores não realizaram análises de impurezas.

Nesta etapa foram avaliados diferentes solventes orgânicos em conjunto com uma fase aquosa (solução de ácido fórmico 0,1% com pH 3,5 ajustado com hidróxido de amônio) no modo de eluição isocrática e gradiente. Devido ao baixo custo e menor toxicidade, estudos preliminares foram realizados com metanol, no entanto, todas apresentaram separação insuficiente, baixa resolução e simetria de pico, características estas, aprimoradas com o uso de acetonitrila. Varaprasad e Ramakrishma (2015), Shirisha et al. (2014) e Pandya, Rathod e Maheswari (2014) ao determinar a LGT e outros compostos também obtiveram melhores resultados utilizando apenas a acetonitrila associada com um regulador de pH.

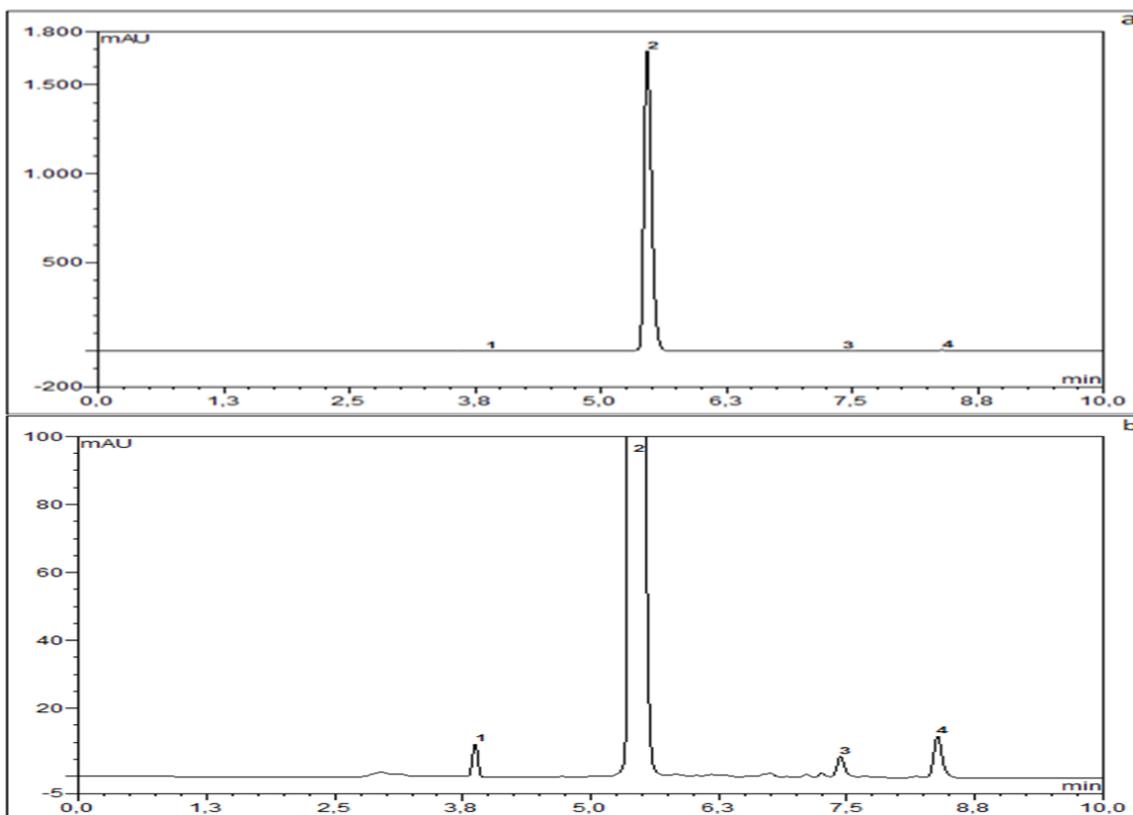
Após testes, as condições cromatográficas de escolha estão apresentadas na tabela 9.

TABELA 9 - Condições cromatográficas utilizadas na validação do método por CLAE-DAD para determinação quantitativa de LGT e impurezas de síntese.

Parâmetros	Descrição
Coluna	Thermo Scientific C8 (5 µm; 4,6 x 150 mm)
Fase móvel	Acetonitrila : solução de ácido fórmico 0,1% (pH 3,5 ajustado com hidróxido de amônio PA) - Eluição gradiente: rampa crescente proporção de ACN de zero a 4 min (30% para 70%) e decrescente na proporção de ACN de 5 a 8 min (70% para 30%).
Vazão	0,6 mL/min
Volume de injeção	20 µL
Temperatura de forno	30 °C
Detecção	Luz ultravioleta no detector de arranjo de diodo. Comprimentos de onda de 294, 278, 268 e 280 nm para a LGT, IMP1, IMP2 e IMP3, respectivamente.
Tempo de corrida	10 minutos

Nas condições da tabela 9, os tempos de retenção foram: 3,91; 5,52; 7,47 e 8,42 min, para a IMP1, LGT, IMP2 e IMP3, respectivamente (figura 8).

FIGURA 8 - Cromatograma da impureza 1 (3,91 min.), linagliptina (5,52 min.), impureza 2 (7,47 min.) e impureza 3 (8,42 min.).



Legenda: Analito 1: impureza 1 (0,180 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Analito 2: Linagliptina (120 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Analito 3: impureza 2 (0,180 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Analito 4: impureza 3 (0,180 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Imagem a: cromatograma em auto escala; Imagem b: cromatograma em escala de -5 a 100 mAU.

A literatura preconiza a verificação dos parâmetros de adequabilidade do sistema para realizar a validação do método analítico (FDA, 1994; BRASIL, 2003; ICH 2005). Dentre estes fatores encontram-se: fator de capacidade (k'), fator de cauda (T) ou simetria, resolução (R) e número de pratos teóricos. A tabela 10 apresenta os valores de adequabilidade do sistema para o método desenvolvido.

TABELA 10 - Parâmetros de adequabilidade do sistema para o método analítico desenvolvido e resultados preconizados pelo FDA (1994)

Parâmetro	Preconizado	IMP1	LGT	IMP2	IMP3
Tempo de retenção (min.)	-	3,91	5,52	7,47	8,42
Fator de capacidade	$k' > 2$	2,03	3,27	4,79	5,52
Fator de cauda	$T \leq 2$	1,06	1,20	1,14	1,19
Número de pratos teóricos	$N > 2000$	5666	8466	13391	13234
Resolução	$R > 2$	-	3,63	3,68	2,63

Legenda: LGT: linagliptina; IMP1: impureza 1; IMP2: impureza 2; IMP3: impureza 3.

5.1.2 Seletividade

A seletividade do método analítico foi realizada por meio da verificação de interferência dos produtos de degradação da LGT-FA, submetida a situações de estresse, e dos excipientes da formulação na quantificação do fármaco linagliptina e impurezas de síntese. Conforme a tabela 11 e a figura 9 são possíveis observar os percentuais de degradação do fármaco em cada condição de estresse.

TABELA 11 - Percentual de degradação da linagliptina em diferentes condições de estresse para avaliar a seletividade do método analítico.

Tempo	Parâmetros						
	UVA	Peróxido 30%	Básica térmica	Ácida térmica	Térmica	Ácida	Básica
15 min.	-	-	17,14	-	-	-	-
30 min.	-	-	31,26	-	-	-	-
45 min.	-	-	44,24	-	-	-	-
1h	4,36	-	58,74	-	9,37	-	-
1h30min	-	-	74,14	-	-	-	-
2h	7,75	6,87	86,57	9,04	10,00	-	-
3h	13,56	-	-	-	8,31	-	-
4h		8,65	-	9,89	-	-	-
6h	34,86	8,73	-	11,11	-	-	-
10h	-	9,85	-	15,50	-	-	-
24h	-	-	-	-	-	3,12	12,06
48h	-	-	-	-	-	-	23,19

Legenda: (-): teste não realizado; UVA: radiação ultravioleta A; h: horas; Básica térmica: solução de hidróxido de sódio (1 mol/L) numa temperatura de 80 °C; Ácida térmica: solução de ácido clorídrico (1 mol/L) numa temperatura de 80 °C; Ácida: solução de ácido clorídrico (1 mol/L); Básica: solução de hidróxido de sódio (1 mol/L); Térmica: temperatura de 60 °C.

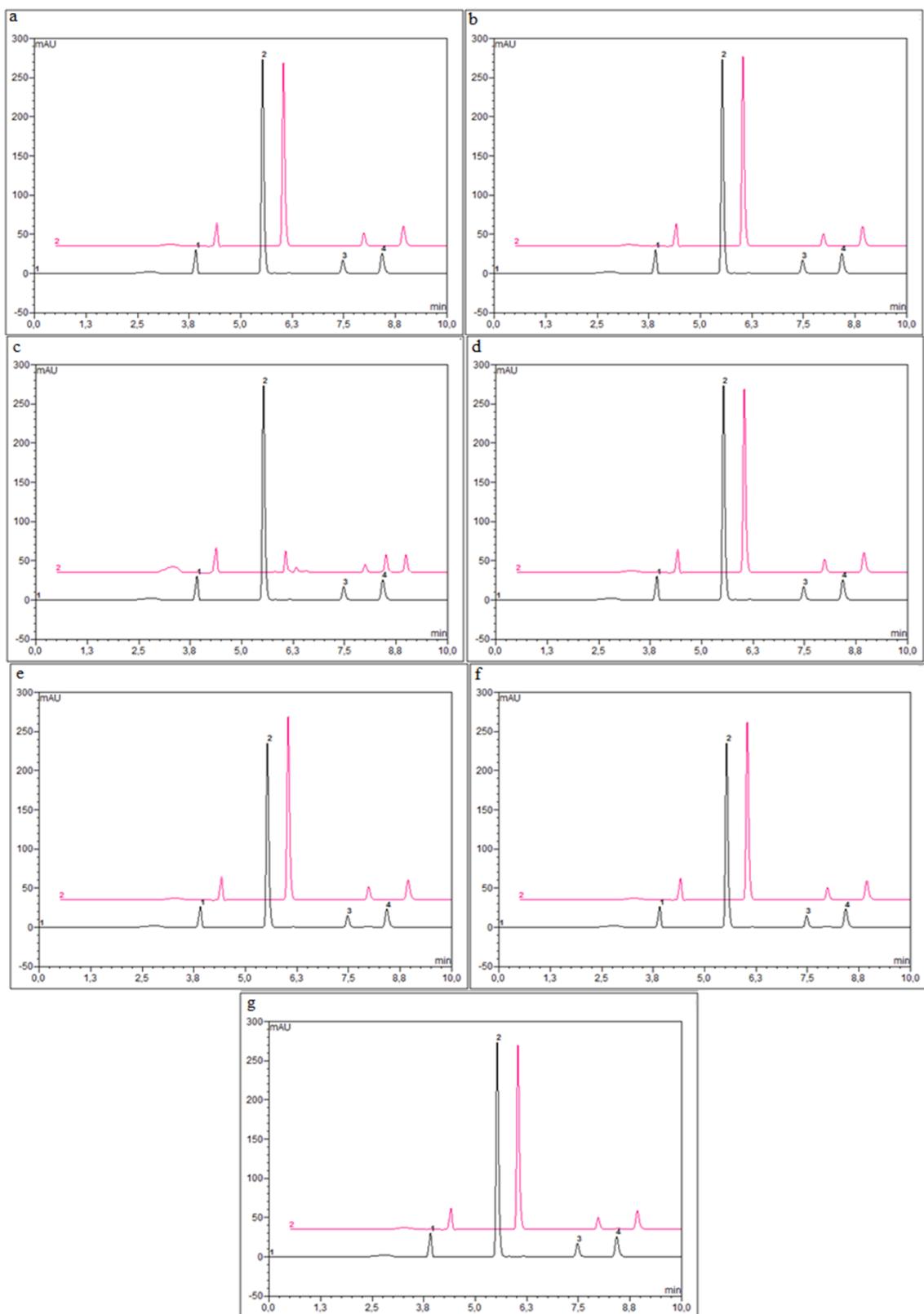
Os resultados demonstraram uma maior instabilidade do fármaco em condições alcalinas, NaOH 1,0 mol/L e NaOH 1,0 mol/L em presença de temperatura, onde obteve-se uma redução de 23,19 e 86,57% na concentração do fármaco, respectivamente (Tabela 11). Além disso, o fármaco mostrou-se também instável em condições fotolíticas, onde degradou aproximadamente 35% sob luz ultravioleta A.

Na condição básica associada à temperatura é possível verificar a formação de produtos de degradação em 5,2 e 8,0 minutos, no entanto, o presente trabalho não objetivou a identificação dos produtos de degradação formados. Engel (2014) ao submeter à solução do fármaco de LGT em condições alcalinas alcalina associada à temperatura (NaOH 2 mol/L à 60 °C), descreve que a possível rota de degradação do fármaco é devido à perda dos grupamentos metilquinazolina e aminopiridina gerando

um composto de m/z 256,23 g/mol ([6E-7-(but-2-il-1-il)-1,3-dimetil-3,7-diidro-1H-purina-2,6-diona] Na^+) como produto de degradação majoritário.

A avaliação de pureza dos picos sugere que em todas as condições avaliadas os picos do fármaco LGT (1,000) e das impurezas de síntese (0,998, 1,000 e 0,998 para impureza 1, 2 e 3, respectivamente) apresentavam-se puros, ou seja, não existiam outras substâncias coeluinto no mesmo tempo de retenção.

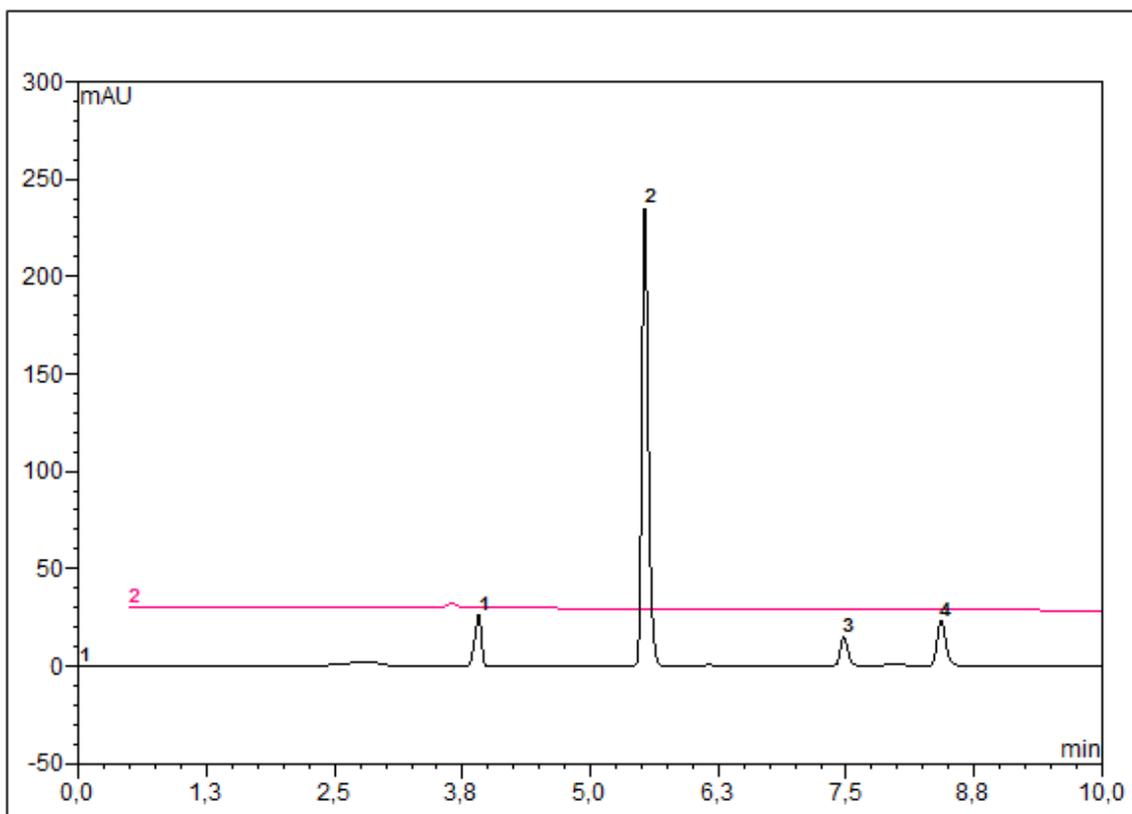
FIGURA 9 - Cromatogramas das condições de degradação em exposição a situações de estresse.



Legenda: Cromatograma 1: tempo zero; Cromatograma 2: exposição à situação de estresse. Analito 1: impureza 1 (3,6 µg/mL); Analito 2: linagliptina (20,0 µg/mL no tempo zero); Analito 3: impureza 2 (3,6 µg/mL); Analito 4: impureza 3 (3,6 µg/mL). Figura a: ultravioleta A; Figura b: peróxido (30%); Figura c: Básica (hidróxido de sódio 1,0 mol/L) associada à temperatura (80 °C); Figura d: ácida (ácido clorídrico 1,0 mol/L) associada à temperatura (80 °C); Figura e: temperatura (60 °C); Figura f: ácida (ácido clorídrico 1,0 mol/L); Figura g: básica (hidróxido de sódio 1,0 mol/L).

A seletividade do método analítico também foi determinada por meio da verificação da interferência dos excipientes da formulação (tabela 4) na detecção e quantificação da LGT e suas impurezas de síntese. No cromatograma abaixo é possível verificar que não houve interferência do placebo com os picos cromatográficos de interesse, demonstrando que o método analítico é seletivo para a determinação de linagliptina e impurezas, conforme a figura 10.

FIGURA 10 - Cromatograma utilizado para avaliação da especificidade.



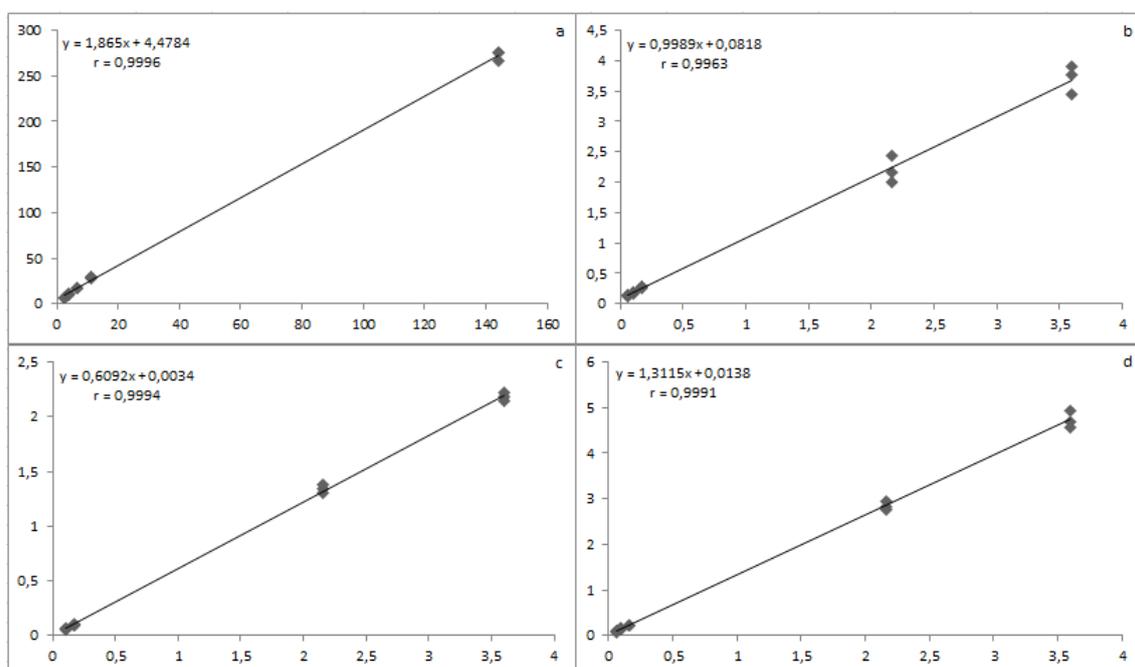
Legenda: Cromatograma 1: Fármaco de linagliptina associado a impureza 1-SQR, impureza 2-SQR e impureza 3-SQR. Cromatograma 2: Excipientes presentes na formulação do fármaco linagliptina. Analito 1: impureza 1 (3,6 µg/mL); Analito 2:

linagliptina (20,0 µg/mL); Analito 3: impureza 2 (3,6 µg/mL); Analito 4: impureza 3 (3,6 µg/mL).

5.1.3 Linearidade

Para análise da linearidade os testes foram realizados em triplicatas e avaliados as concentrações de 2,41, 4,03, 6,71, 11,19 e 144 µg/mL para a linagliptina e 0,060, 0,100, 0,167, 2,16 e 3,6 µg/mL para as impurezas. Na figura 11, são apresentadas as equações das regressões lineares realizada pelo método dos mínimos quadrados e os respectivos coeficientes de correlação (r) obtidos para as curvas analíticas. Estes resultados demonstraram uma alta correlação entre a concentração dos analitos analisados e a resposta do equipamento.

FIGURA 11 - Representação gráfica das curvas de calibração da linagliptina (a); impureza 1 (b); impureza 2 (c) e impureza 3 (d).



A comprovação da relação linear entre a concentração dos analitos e a resposta do equipamento foi realizada por meio da análise de variância (tabela 12) dos diferentes níveis de concentração da LGT e suas impurezas. Os resultados demonstraram-se significativos para regressão linear e não significativos para desvio de linearidade, comprovando assim, uma correlação linear entre as variáveis.

TABELA 12 - Análise de variância dos resultados de linearidade da linagliptina e impurezas

Linagliptina					
Fontes de variação	Gl	SQ	Variância	F	F tab
Entre	4	170600,14	42650,03	8607,23	
Regressão linear	1	170545,20	170545,20	34417,85	
Desvio da linearidade	3	54,94	18,31	3,69*	3,71
Dentro	10	49,55	4,95		
Total	14				
Impureza 1					
Entre	4	34,91	8,72	414,21	
Regressão linear	1	34,90	34,90	1656,37	
Desvio da linearidade	3	0,01	0,003	0,16*	3,71
Dentro	10	0,01	0,02		
Total	14				
Impureza 2					
Entre	4	19,56	4,89	3033,38	
Regressão linear	1	19,55	19,55	12129,68	
Desvio da linearidade	3	0,006	0,002	1,27*	3,71
Dentro	10	0,016	0,001		
Total	14				
Impureza 3					
Entre	4	59,38	14,84	1757,47	
Regressão linear	1	59,38	59,38	7029,88	
Desvio da linearidade	3	0,0002	$6,8 \times 10^{-05}$	0,008*	3,71
Dentro	10	0,08	0,008		
Total	14				

* não significativo para p=0,05

5.1.4 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) são propriedades de desempenho importantes na validação do método e são usados para descrever a

menor concentração de uma substância que pode ser mensurado de forma confiável por um procedimento analítico. De uma forma geral, o LD é adotado como a menor concentração que um analito pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado, sob as condições indicadas do teste. Seu limite pode ser calculado com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base (BRASIL 2003; ICH, 2005). O LQ é a menor concentração de um analito que pode ser determinada como aceitáveis para a precisão e exatidão, nas condições estabelecidas de teste (AOAC, 2002). O LQ é um dos parâmetros principais, para ensaios quantitativos de impurezas e produtos de degradação em fármacos, expressando assim a concentração do analito na amostra. A tabela 13 demonstra os valores encontrados de LD e LD para a linagliptina e suas impurezas de síntese.

TABELA 13 - Limite de detecção e quantificação da linagliptina e impurezas obtidos na validação do método analítico por CLAE.

	Limite de detecção (µg/mL)	Limite de quantificação (µg/mL)
Linagliptina	0,0171	0,060
Impureza 1	0,0156	0,060
Impureza 2	0,0147	0,060
Impureza 3	0,0168	0,060

5.1.5 Precisão

A precisão foi obtida pela repetição de seis amostras dos comprimidos, pesadas de forma separada e adicionada as impurezas, no mesmo dia. Na precisão intermediária foi obtida pela média dos teores obtidos de cada amostra (n=18), conforme descrito na tabela 14 abaixo.

TABELA 14 – Resultados de precisão intradia e interdia obtidos para a validação do método analítico por CLAE para a linagliptina impurezas

Precisão intradia (n=6)								
	LGT		IMP1		IMP2		IMP3	
	Teor (%)	DPR						
Dia 1	99,83	0,73	99,12	3,55	102,39	3,44	100,82	3,45
Dia 2	99,57	1,33	99,78	3,00	101,76	4,52	101,31	4,63
Dia 3	97,50	1,47	101,63	4,54	102,92	2,06	102,65	2,50
Precisão interdia (n=18)								
	LGT		IMP1		IMP2		IMP3	
	Teor (%)	DPR						
	98,97	1,36	100,17	4,14	102,35	3,50	101,59	4,08

Legenda: LGT: linagliptina; IMP1: impureza 1; IMP2: impureza 2; IMP3: impureza 3; DPR: desvio padrão relativo;

Os resultados demonstram a precisão intradia e interdia do método desenvolvido, pois os valores de DPR encontram-se conforme o especificado para fármacos em produtos acabados (< 2,0%) e para impurezas de síntese (< 20,0%), de acordo com ERMER e MILLER (2005).

5.1.6 Exatidão

A exatidão foi determinada através da adição de SQR a solução amostra (LGT-FA) visando verificar a relação entre a concentração observada e a nominal. Para isto, realizou o acréscimo de quantidades de 6,0, 12,0 e 24,0 µg/mL para a LGT e 0,12, 0,30 e 0,60 µg/mL de cada impureza, correspondendo aos níveis baixo, médio e alto, respectivamente. Conforme a tabela 16, os dados apresentados estão em conformidade com a Ermer e Miller (2005) que estabelece um desvio padrão relativo na recuperação de até 1% pela metodologia de adição do padrão para determinações de fármacos e de até 20% para determinações de impurezas também pelo método de adição de SQR. Os autores também relatam que esta alta faixa de aceitabilidade do DPR para análise de

impurezas é devido à utilização de baixas concentrações do analito (0,120-0,300 µg/mL).

De acordo com Ermer e Miller (2005), a faixa de recuperação preconizada para fármacos é de 98 a 102% e para as impurezas deve estar na faixa de 80 a 120%. Os resultados encontrados estão dentro das faixas estabelecidas, demonstrando a exatidão do método desenvolvido (Tabela 15).

TABELA 15 - Resultados da exatidão obtidos pelo teste de recuperação para validação do método analítico por CLAE para determinação de LGT e impurezas de síntese.

	Nível	Concentração (µg/mL)	Recuperação (%)	Média (%)	DPR
LGT	Baixo	125,561	99,65		
	Médio	131,98	99,98	99,79	0,17
	Alto	143,653	99,75		
IP1	Baixo	0,111	92,61		
	Médio	0,262	87,34	93,12	6,49
	Alto	0,596	99,40		
IP2	Baixo	0,105	87,74		
	Médio	0,282	94,15	92,92	5,03
	Alto	0,581	96,85		
IP3	Baixo	0,117	97,65		
	Médio	0,285	95,26	93,99	4,71
	Alto	0,534	89,07		

5.1.7 Robustez

A avaliação da robustez foi realizada a partir da quantificação do fármaco LGT e de suas impurezas de síntese utilizando pequenas alterações nas condições cromatográficas do método analítico e em condições nominais de trabalho. Os resultados e as condições utilizadas estão descritos na tabela 16.

TABELA 16 - Parâmetros avaliados e respostas obtidas na robustez da linagliptina e impurezas

Parâmetros – Robustez						
		pH	F.M.	T °C	Vazão	λ
LGT	%M±DP	100,0±0,58	100,0±0,34	100,0±0,61	99,8±0,57	99,9±0,60
	DPR	0,58	0,34	0,61	0,58	0,60
IMP1	%M±DP	100,0±1,61	100,0±0,77	99,9±1,47	99,8±2,37	99,9±0,92
	DPR	1,61	0,77	1,47	2,37	0,92
IMP2	%M±DP	100,3±2,54	100,0±2,67	100,3±1,96	100,7±2,63	99,7±2,41
	DPR	2,53	2,67	1,95	2,61	2,41
IMP3	%M±DP	100,5±1,49	100,0±1,39	100,2±0,67	100,2±1,64	100,0±1,13
	DPR	1,48	1,39	0,66	1,64	1,13

Legenda: LGT: linagliptina; IMP1: impureza 1; IMP2: impureza 2; IMP3: impureza 3; F.M.: fase móvel; T °C: temperatura; λ : comprimento de onda; %M±DP: percentual médio ± desvio-padrão; DPR: desvio-padrão relativo.

A tabela 17 apresenta a avaliação estatística realizada para verificar se a modificação nas condições analíticas poderia interferir na quantificação do fármaco e das impurezas de síntese. Os resultados encontrados demonstram que não existe diferença estatística significativa utilizando o teste T de *Student* para $p=0,05$.

TABELA 17 - Respostas estatísticas da aplicação do teste T de Student através da comparação os parâmetros avaliados com o parâmetro nominal

Parâmetro	Variação	<i>p-valor</i>			
		LGT	IMP1	IMP2	IMP3
pH	(-)	0,68	0,80	0,68	0,07
	(+)	0,14	0,23	0,53	0,63
Fase móvel	(-)	0,93	0,49	0,58	0,19
	(+)	0,82	0,18	0,49	0,32
Temperatura	(-)	0,18	0,63	0,22	0,14
	(+)	0,09	0,60	0,15	0,70
Vazão	(-)	0,06	0,30	0,49	0,75
	(+)	0,25	0,08	0,63	0,87
Comprimento de onda	(-)	0,21	0,14	0,97	0,60
	(+)	0,91	0,36	0,12	0,48

Legenda: LGT: linagliptina; IMP1: impureza 1; IMP2: impureza 2; IMP3: impureza 3.

5.1.9 Cinética de degradação

A tabela 18 apresenta os valores de concentrações, logaritmo natural da concentração ($\ln C$) e inverso da concentração ($1/C$) utilizados para a definição da ordem da reação da degradação da LGT nos comprimidos em condições de hidrólise alcalina e temperatura (NaOH 1,0 mol/L a 80 °C).

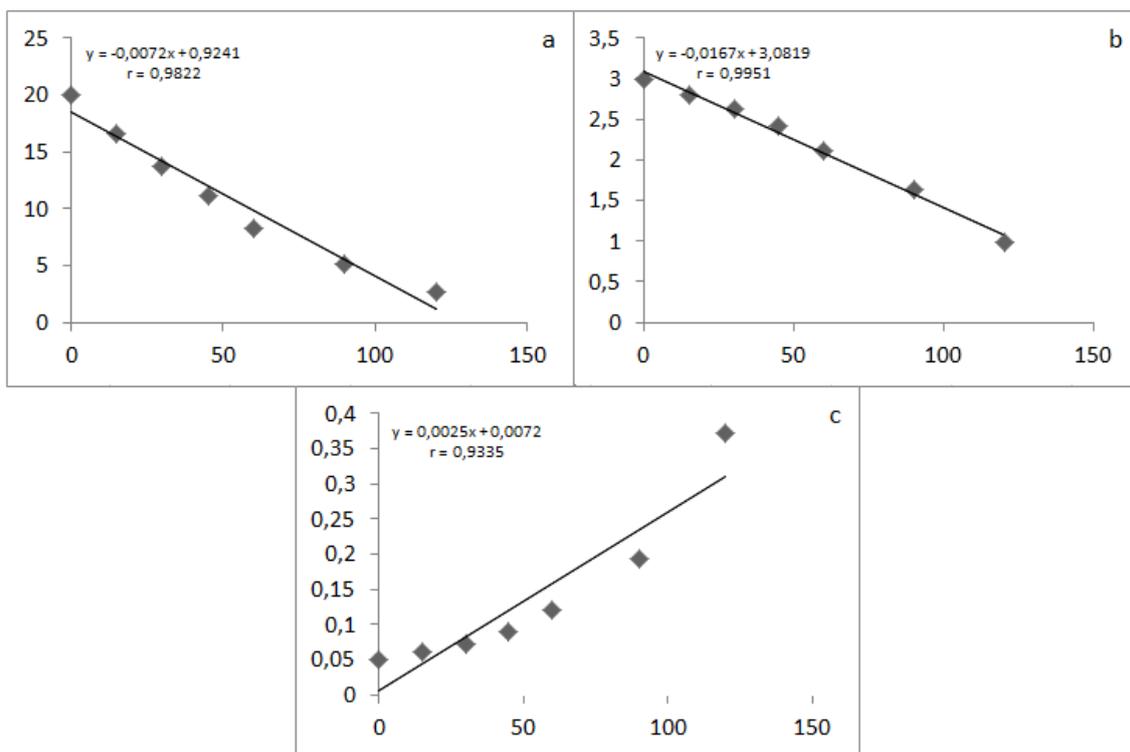
TABELA 18 - Valores obtidos para construção dos gráficos e definição da ordem de reação de degradação do fármaco LGT nos comprimidos.

Tempo	LGT ($\mu\text{g/mL}$)	$\ln C$	$1/C_0$
0	20	2,99	0,05
15	16,57	2,80	0,06
30	13,74	2,62	0,07
45	11,15	2,41	0,08
60	8,25	2,11	0,12
90	5,17	1,64	0,19
120	2,68	0,98	0,37

Legenda: LGT: linagliptina; $\ln C$: logaritmo natural da concentração de linagliptina; $1/C_0$: inverso da concentração no tempo zero de linagliptina.

As reações de degradação de um fármaco ocorrem em velocidades definidas e dependem da natureza química e das condições pelo qual foi exposto. Neste sentido e objetivando a definição da ordem e da velocidade de reação são necessários estudos de cinética química. Lachman et al. (2001) descrevem que a degradação pode ocorrer em três ordens, sendo elas: ordem zero (velocidade é independente da concentração), primeira ordem (velocidade de degradação é dependente da concentração) e segunda ordem (velocidade de reação é de dois fatores). No presente estudo, os gráficos representando as ordens da reação estão demonstrados na figura 12.

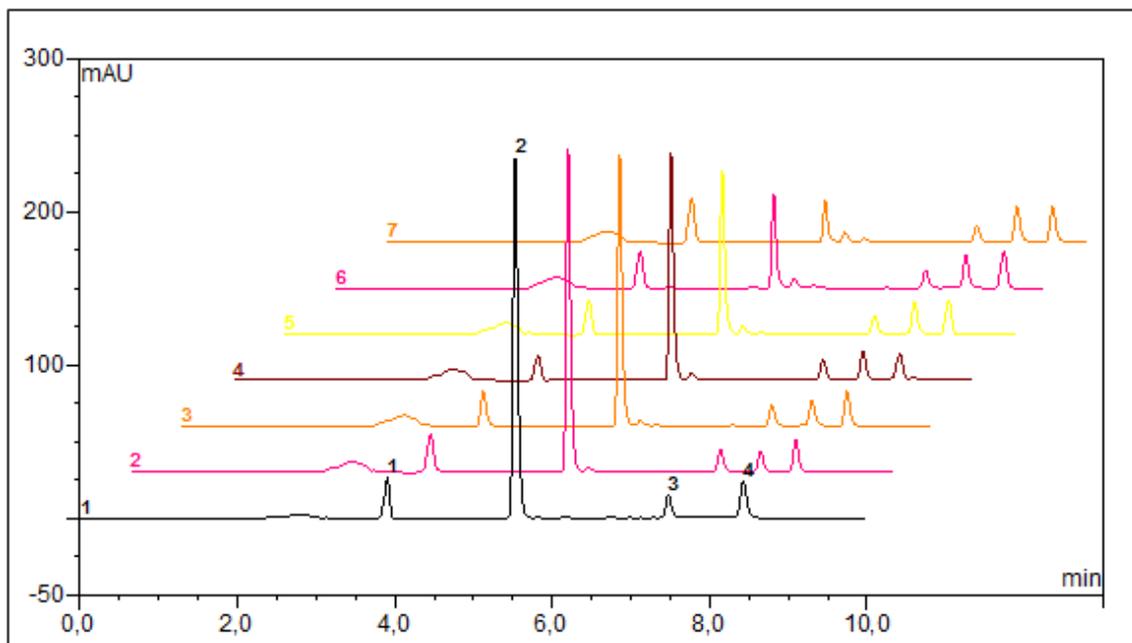
FIGURA 12 - Gráficos das diferentes ordens de cinética da degradação de linagliptina-fármaco.



Legenda: Gráfico a: zero ordem (eixo y: concentração de linagliptina dividida pela concentração no tempo zero de linagliptina; eixo x: tempo); Gráfico b: primeira ordem (eixo y: logaritmo natural da concentração de linagliptina; eixo x: tempo); Gráfico c: segunda ordem (eixo y: um dividido pela concentração no tempo zero de linagliptina; eixo x: tempo).

De acordo com os valores encontrados dos coeficientes de correlação, verificou-se que a degradação de LGT nos comprimidos em condições alcalinas e de temperatura (NaOH 1,0 mol/L a 80 °C) obedece a uma cinética de primeira ordem, ou seja, a velocidade de degradação é diretamente proporcional à concentração do fármaco. A figura 13 demonstra os cromatogramas obtidos para avaliação da cinética neste estudo.

FIGURA 13 - Cromatogramas da cinética de degradação através da exposição da linagliptina em meio básico (hidróxido de sódio 1,0 mol/L) associado à temperatura (80 °C).



Legenda: Cromatograma 1: tempo zero; Cromatograma 2: tempo de 15 minutos; Cromatograma 3: tempo de 30 minutos; Cromatograma 4: tempo de 45 minutos; Cromatograma 5: tempo de 60 minutos; Cromatograma 6: tempo de 90 minutos; Cromatograma 7: tempo de 120 minutos; Analito 1: impureza 1 (3,6 µg/mL); Analito 2: linagliptina (20,0 µg/mL no tempo zero); Analito 3: impureza 2 (3,6 µg/mL); Analito 4: impureza 3 (3,6 µg/mL). Obs. Os cromatogramas foram levemente deslocados para facilitar a visualização.

Após avaliação da ordem de reação foram calculados os parâmetros cinéticos, os quais estão apresentados na tabela 19.

TABELA 19 - Parâmetros cinéticos calculados para fármaco de LGT.

Parâmetros cinéticos	Valores
k (µg/min)	0,1897
$T_{90\%}$ (min)	10,543
$T_{1/2}$ (min)	52,7151

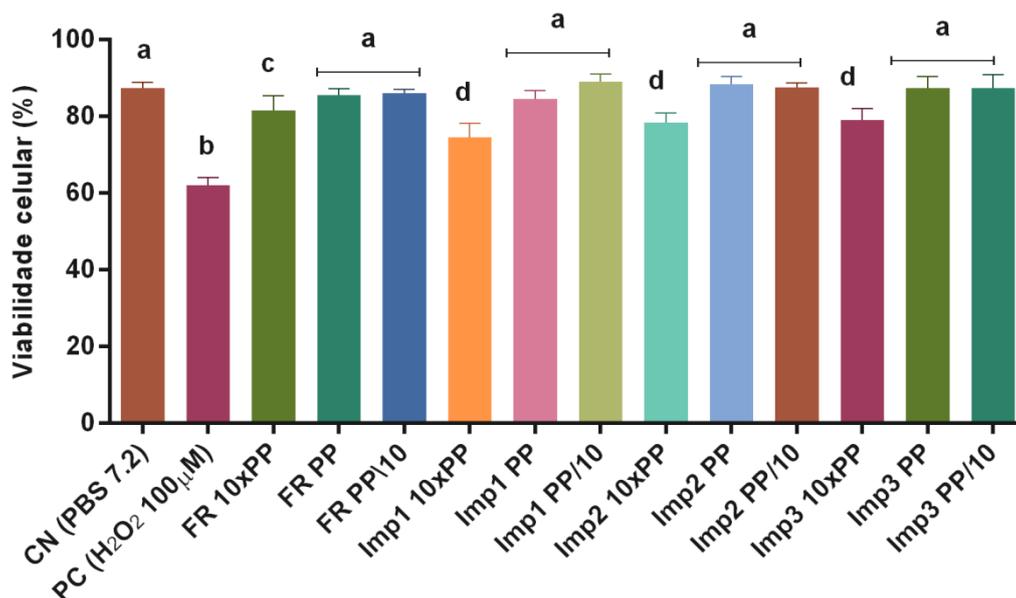
Os resultados obtidos na determinação da cinética de reação são importantes condições ideais de manipulação do produto durante a produção, o controle de qualidade, o armazenamento e embalagem das matérias-primas e dos comprimidos (LACHMAN et al.; 2001).

5.2 Segurança biológica do fármaco LTG e suas impurezas de síntese

5.2.1 Parâmetro citotóxico -Viabilidade celular

Os resultados encontrados no teste de viabilidade celular (figura 14) em leucócitos humanos demonstram que apenas na concentração 10 vezes superior à concentração máxima a LGT reduz a viabilidade celular, demonstrando a segurança do fármaco nas condições do estudo. A avaliação dos resultados para impurezas evidencia que houve uma redução na viabilidade celular a uma concentração equivalente a 10% da concentração plasmática máxima do fármaco.

FIGURA 14 - Gráfico do percentual da viabilidade celular frente à linagliptina-substância química de referência e impurezas



Legenda: CN: controle negativo; PC: controle positivo; FR: linagliptina-substância química de referência; Imp1: impureza 1; Imp2: impureza 2; Imp3: impureza 3; FR 10xPP: dez vezes a concentração do pico plasmático da linagliptina; FR PP: concentração do pico plasmático da linagliptina; FR 10/PP: dez por cento da concentração do pico plasmático da linagliptina. Imp (1, 2 e 3) 10xPP: dez por cento da concentração do pico plasmático da linagliptina; Imp (1, 2 e 3) PP: um por cento da concentração do pico plasmático da linagliptina; Imp (1, 2 e 3) 10/PP: zero vírgula um por cento da concentração do pico plasmático da linagliptina.

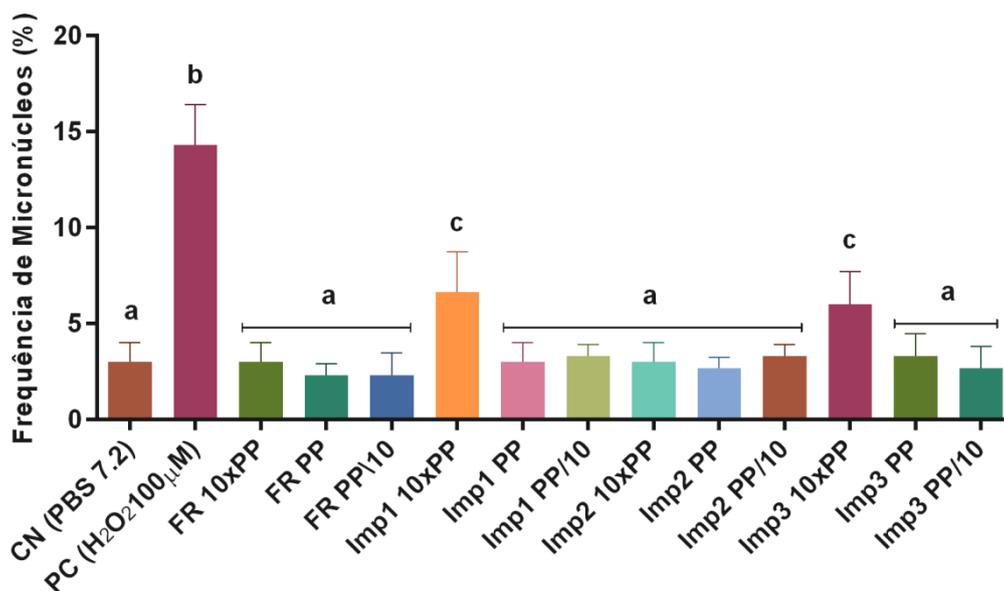
*Letras semelhantes não diferem estatisticamente e letras diferentes diferem estatisticamente.

5.2.2 Parâmetro mutagênico - Teste de Micronúcleo

No teste de contagem de micronúcleos (figura 15) apenas as impureza 1 e 3 na concentração equivalente a 10% da concentração plasmática máxima do fármaco apresentaram significância estatística quando comparada ao controle negativo, ou seja, apresentaram significativamente mais formação de micronúcleos que o controle negativo. As outras amostras avaliadas (LGT (10x PP, PP e 10/PP), impureza 1 (PP e 10/PP), impureza 2 (10x PP, PP e 10/PP) e impureza 3 (PP e 10/PP)) não apresentaram

diferença significativa entre os grupos, bem como não houve diferença entre as concentrações testadas.

FIGURA 15 - Gráfico do percentual da frequência de micronúcleos frente à linagliptina-substância química de referência e impurezas.



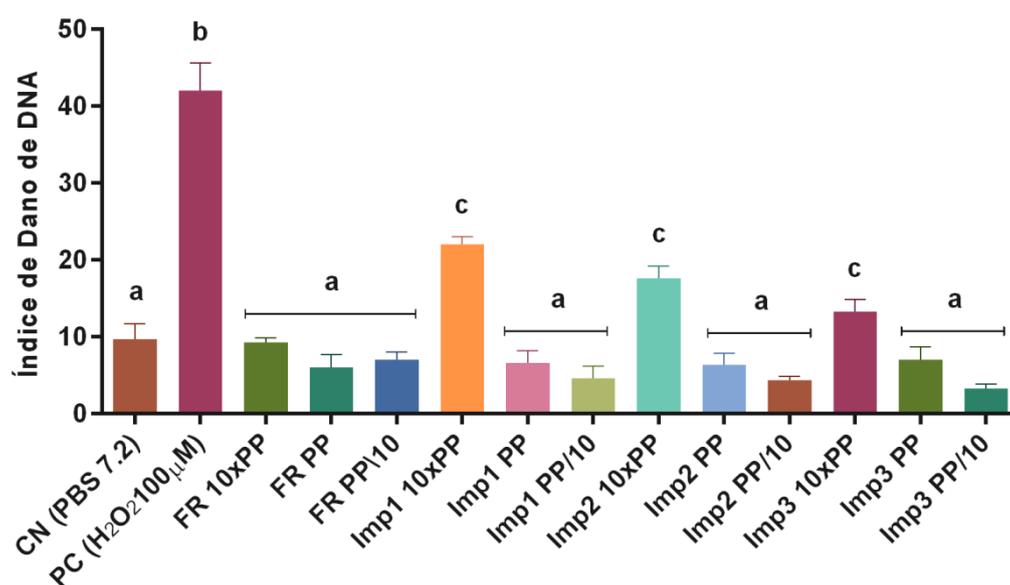
Legenda: CN: controle negativo; PC: controle positivo; FR: linagliptina-substância química de referência; Imp1: impureza 1; Imp2: impureza 2; Imp3: impureza 3; FR 10xPP: dez vezes a concentração do pico plasmático da linagliptina; FR PP: concentração do pico plasmático da linagliptina; FR 10/PP: dez por cento da concentração do pico plasmático da linagliptina. Imp (1, 2 e 3) 10xPP: dez por cento da concentração do pico plasmático da linagliptina; Imp (1, 2 e 3) PP: um por cento da concentração do pico plasmático da linagliptina; Imp (1, 2 e 3) 10/PP: zero vírgula um por cento da concentração do pico plasmático da linagliptina.

*Letras semelhantes não diferem estatisticamente e letras diferentes diferem estatisticamente.

5.2.3 Parâmetro genotóxico - Teste Cometa

A partir do teste Cometa, os resultados (figura 16) demonstram que nas impurezas 1, 2 e 3 na concentração de 10x PP houve dano no DNA. Já para o fármaco LGT em todas as suas concentrações e as impurezas 1, 2 e 3 nas outras concentrações testadas (PP e PP/10) os índices foram semelhantes ao CN, não apresentando assim diferença estatística significativa.

FIGURA 16 - Gráfico do percentual do índice de dano de DNA frente à linagliptina-substância química de referência e impurezas.



Legenda: CN: controle negativo; PC: controle positivo; FR: linagliptina-substância química de referência; Imp1: impureza 1; Imp2: impureza 2; Imp3: impureza 3; FR 10xPP: dez vezes a concentração do pico plasmático da linagliptina; FR PP: concentração do pico plasmático da linagliptina; FR 10/PP: dez por cento da concentração do pico plasmático da linagliptina; Imp (1, 2 e 3) 10xPP: dez por cento da concentração do pico plasmático da linagliptina; Imp (1, 2 e 3) PP: um por cento da concentração do pico plasmático da linagliptina; Imp (1, 2 e 3) 10/PP: zero vírgula um por cento da concentração do pico plasmático da linagliptina.

*Letras semelhantes não diferem estatisticamente e letras diferentes diferem estatisticamente.

Estes resultados demonstram a importância da realização da determinação quantitativa das impurezas e dos testes de segurança biológica, pois todas as impurezas na concentração equivalente a 10% da concentração plasmática máxima do fármaco (PP) apresentaram atividade genotóxica, evidenciando uma possível relação com malformações, doenças congênitas, doenças genéticas e degenerativas, envelhecimento celular, neoplasias, entre outras (SCHERER et al. 2013).

Os resultados estudos de segurança biológica demonstram a importância do controle de qualidade e da necessidade da determinação qualitativa e quantitativa das impurezas de síntese no produtos farmacêuticos contendo o fármaco LGT.

6. CONCLUSÕES

O método desenvolvido e validado por CLAE mostrou-se simples, linear, preciso, exato e robusto para quantificar o fármaco LGT e suas principais impurezas, condições necessárias para utilização no controle de qualidade deste produto.

O fármaco linagliptina mostrou-se instável em condições fotolíticas (UV-A) oxidativas (H_2O_2 30%), alcalinas (NaOH 1,0 mol/L), ácidas (HCl 1,0 mol/L), térmicas (60 °C), alcalina associada a temperatura (NaOH 1,0 mol/L + 80 °C) e ácida associada a temperatura (HCl 1,0 mol/L + 80 °C), os produtos de degradação formados não interferiram na quantificação do fármaco e de suas principais impurezas, ou seja, o método apresenta-se como indicativo de estabilidade do fármaco e adequado para quantificação de suas impurezas de síntese;

A degradação da amostra dos comprimidos da LGT em condição básica (NaOH 1,0 mol/L) associada a temperatura (80 °C), obedeceu a uma cinética de primeira ordem, ou seja, a velocidade de degradação é diretamente proporcional à concentração do fármaco.

Os valores de LD e LQ encontrados demonstram a sensibilidade do método desenvolvido para quantificar a linagliptina e, principalmente, suas impurezas de síntese.

No teste de citotoxicidade, a LGT na concentração 10 vezes superior à (pico plasmático) e as impurezas 1, 2 e 3 na concentração equivalente a 10% da concentração plasmática máxima do fármaco, reduziram a viabilidade celular.

No teste mutagenicidade, a impureza 1 e 3 na concentração equivalente a 10% da concentração plasmática máxima do fármaco, aumentaram significativamente a formação de micronúcleos.

No teste de genotoxicidade, as impurezas 1, 2 e 3 na concentração equivalente a 10% da concentração plasmática máxima do fármaco, induziram a danos ao DNA através do teste cometa.

Os ensaios de segurança biológica ressaltam a importância do controle quantitativo das impurezas presentes, pois os resultados demonstraram o risco de toxicidade em caso de uma concentração de 10% de impurezas no produto final.

REFERÊNCIAS

ACD LABS. **Software: ACDChemSketch**, versão 12.01, 2010. Disponível em <http://www.acdlabs.com/>

ALSANTE, K. M., et al. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 29-37, 2007.

ALVES, A.L.G., et al. Protocolo de isolamento de células mononucleares da medula óssea de equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 4, p. 650 – 655, 2009.

AOAC INTERNATIONAL. **Method validation programs**. Peer verified programs. Gaithersburg, Maryland, USA; 2002.

ARAÚJO, G.L.B. **Caracterização no estado sólido dos polimorfos da tibolona**. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos Área de Produção e Controle Farmacêuticos) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2009.

ARCHANA, M.; SRIRAM, N., GAYASUDDIN, Md. Method development and validation of RP-HPLC method for determination of new antidiabetic agent linagliptin in bulk and in pharmaceutical formulation. **International Journal of Medicinal Chemistry & Analysis**, v. 3, n. 1, p.1-5, 2013.

AV. Agencia Valenciana de La Salud. **Trajenta-linagliptina**, 2012. Disponível em http://www2.san.gva.es/cas/prof/dgf/farmacia/pdf/Informe_tecnico_de_evaluacion_de_linagliptina_60.pdf . Acesso em 10 março de 2016.

BASAK, A. K., et al. Pharmaceutical impurities: regulatory perspective for Abbreviated New Drug Applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 1, p. 64-72, 2007.

BERNARDO, N.P. **Análise estereosseletiva de cloridrato de cis-tramadol e de suas impurezas em matéria-prima e formulações farmacêuticas**. 112f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, 2008.

BIFTU, T., et al. Novel tetrahydropyran analogs as dipeptidyl peptidase IV inhibitors: Profile of clinical candidate (2R,3S,5R)-2-(2,5-difluorophenyl)-5-[2-(methylsulfonyl)-2,6-dihydropyrrolo[3,4-c]pyrazol-5(4H)-yl] tetrahydro-2H-pyran-3-amine (23). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 5361–5366, 2013.

BOOVIZHIKANNAN, T.; PALANIRAJAN, V. K. RP-HPLC determination of vildagliptin in pure and in tablet formulation. **Journal of Pharmacy Research** v. 7, p. 113-116, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. **Diário Oficial da União de 04 de julho de 2011**, Brasília, DF, n. 126, 04 julho 2011. Suplemento - Seção I, p. 61. Acesso em: 14 nov. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/RE_899_validacao.pdf>. Acesso em 14 nov. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. **Resolução Nº 57, de 17 novembro 2009**. Dispoe sobre o regime de insumos farmacêuticos ativos e das outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 17 nov. 2009. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c2f67f0046f1cc01ab9ebb41cdd33a01/RDC+57-2009+Registro+-+IFA.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 14 nov. 2014.

BUCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Revista ACTA Amazonica**, v. 36, n. 3, p. 357 – 364, 2006.

BUROW, M.E., et al. Differences in Susceptibility to Tumor Necrosis Factor α -induced Apoptosis among MCF-7 Breast Cancer Cell Variants. **Cancer Research**. v. 58, p. 4940-4946, 1998.

CARRARD, V., et al. Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal. **Revista Facial Odontologia**, Porto Alegre, v. 48, n. 1/3, p. 77-81, 2007.

DING, H. X., et al. Christopher J. Synthetic approaches to the 2011 new drugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, p. 2795-2825, 2013.

ECKHARDT, M., et al. 8-(3-(R)- Aminopiperidin-1-yl)-7-but-2-ynyl-3-methyl-1-(4-methyl-quinazolin-2-ylmethyl)-3,7-dihydropurine-2,6-dione (BI 1356), a Highly Potent, Selective, Long-Acting, and Orally Bioavailable DPP-4 Inhibitor for the Treatment of Type 2 Diabetes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 6450-6453, 2007.

EL-BAGARY, R. I.; ELKADY, E. F.; AYOUB, B. M. Liquid chromatographic determination of linagliptin in Bulk, in Plasma and in its Pharmaceutical Preparation. **International Journal of Biomedical Science**, v. 8, n. 3, p. 209-214, 2012.

EMA. European Medicines Agency. **Trajenta – linagliptina**, 2012. Disponível em http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_Public_assessment_report/human/002110/WC500115748.pdf. Acesso em 10 fevereiro de 2015.

ENGEL, R.E.A. **Desenvolvimento de método analítico indicativo de estabilidade para controle de qualidade químico e biofarmacêutico de linagliptina**. 142f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Porto alegre, 2014.

ERMER J.; MILLER J.H. McB. **Method Validation in Pharmaceutical Analysis**. A Guide to Best Practice. Eds. Weinheim: Wiley-VCH, 2005

EUROPEAN PHARMACOPEIA. **European Directorate for the Quality of Medicines**. Strasbourg; 2007.

FDA. Food and Drug Administration. **Highlights of prescribing information**. Revisado em maio 2011. Disponível em http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2012/201280s005lbl.pdf. Acesso em 14 de novembro de 2014.

FDA. Food and Drug Administration. **Validation of Chromatographic Methods**. Reviewer Guidance. November, 1994. Disponível em <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf>. Acesso em 14 de novembro de 2014.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**. v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FERREIRA, V. A.; CAMPOS, S. M. B. Avanços farmacológicos no tratamento do Diabetes tipo 2. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**. v. 8, n. 3, p. 72-78, 2014.

FILHO, G.B. **Bogliolo Patologia**. 8 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2011.

FRANÇA, F. D. **Avaliação das linhagens VERO e MDCK na sinalização celular e como alternativas para estudo da nefrotoxicidade utilizando anfotericina B**. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte, 2008.

ICH – **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. Impurities in New Drug Substances - Q3A (R2). ICH Steering Committee: Switzerland, 2006.

ICH – **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. Impurities in New Drug Products - Q3B (R2). ICH Steering Committee: Switzerland, 2006.

ICH – **International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use**. Impurities: Guideline for Residual Solvents - Q3C (R5). ICH Steering Committee: Switzerland, 2005.

KAVITHA. K. Y., et al. Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for the simultaneous estimation of linagliptin and metformin in pure and pharmaceutical dosage. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 5, n.1, p. 230-235, 2013.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. Testes de estabilidade e fundamentos da cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.; KANIG, J. (Ed). **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001, v. 2, Cap.26, p. 1277-1355.

LOPEZ, G. T. **Efeitos do antimoniato de n-metilglucamina e SbV sobre parâmetros citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em cultura de leucócitos humanos**. 2015. 108 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pampa, Rio Grande do Sul, 2015.

NEUMILLER, J. J.; SETTER, S. M. Review of Linagliptina for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **Clinical Therapeutics**, v. 34, n. 5. p. 993 - 1005, 2012.

NG L.; LUNN G.; FAUSTINO P. Organic impurities in drug substance: origin, control, and measurement. In: **Analysis of Drug Impurities**. SMITH R.J.; WEBB. M.L. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p 1 - 46.

PANDYA, R.H.; RATHOD, R.; MAHESWARI, D.G. Bioanalytical method development and validation for simultaneous determination of linagliptin and metformin drugs in human plasma by RP-HPLC method. **Pharmacophore na International Research Jornal**, v. 5, n. 2, p. 202-218, 2014.

PAULA, D. J. C. **Análise de custo e efetividade do tratamento de diabéticos adultos atendidos no centro hiperdia de Juiz de Fora, MG**. Dissertação (Mestrado Saúde Coletiva) - Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, 2014.

PETINARI, L. **Citotoxicidade do tamoxifeno em linhagens normais e tumorais e sua capacidade de induzir a transformação celular *in vitro***. Dissertação (Mestrado Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

POLETTI, P., et al. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (mart. Ex benth. J. F. Macbr: fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. **Revista Pesquisa & Criação**. Rondônia , v. 10, n. 1, p. 163 - 175, 2011.

PRESTON R.J.; HOFFMANN G.R. Toxicologia Genética. In: KLAASSEN, C.D.; WATKINS III, J.B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull**. 2 ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. p. 123-136.

RAJASEKARAN, A.; KAVITHA, R.; ARIVUKKARASU, R. Development and validation of HPTLC method for simultaneous estimation and formulation. **World Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, p. 317-327, 2014.

ROWE R. C. B.; SHESKEY P. J.; QUINN M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 6^a ed, 2009. London, UK: Pharmaceutical Press e Washington, DC: American Pharmacists Association, 2009. p. 1-888.

ROY, J. Pharmaceutical Impurities- A Mini-Review. **AAPS PharmSciTech**, v. 3, n. 2, p.1 - 8, 2002.

RXLIST. **The Internet Drug Index**. Disponível em <http://www.rxlist.com/tradjenta-drug/clinical-pharmacology.htm>. Acesso 6 de abril de 2016.

SAMPAIO, J., et al. Estudo da genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* após exposição aguda e subcrônica de extratos aquosos de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. obtidos por infusão. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 10, n. 4, p. 462-467, 2012.

SANTOS MONTAGNER, G. F. F., et al. Toxicological Effects Of Ultraviolet Radiation On Lymphocyte Cells With Different Manganese Superoxide Dismutase Ala16val Polymorphism Genotypes. **Toxicology In Vitro**, v. 24, n. 5, p. 1410 - 1416, 2010.

SBD. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes**. Sociedade Brasileira de Diabetes. 3 ed., Itapevi/SP: A. Araújo Silva Farmacêutica, 2009.

SBD. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2013-2014**. Sociedade Brasileira de Diabetes São Paulo; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. – São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.

SBD. SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Tudo sobre diabetes**. 2013. Disponível em <<http://www.diabetes.org.br/para-o-publico/tudo-sobre-diabetes>>. Acesso em: 14 de nov. 2014.

SBEM. SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA. Disponível em: <<http://www.endocrino.org.br/numeros-do-diabetes-no-brasil>>. Acesso em: 14 nov. 2014.

SCHEEN, A. J. DPP-4 inhibitors in the management of type 2 diabetes: A critical review of head-to-head trials. **Diabetes & Metabolism**, v. 38, p. 89 - 101, 2012

SCHERER, K.; STROHSCHOEN, A. Padronização do teste cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área da saúde. **Revista Destaques Acadêmicos**, CCBS/Univates ,v. 5, n. 3, p. 49-60, 2013.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutation Research**, v. 31, n. 1, p. 09-15, 1975.

SHIRISHA, S., et al. Development and Validation of RP-HPLC Method for simultaneous estimation of metformin and linagliptin in combined pharmaceutical dosage form. **International journal of pharma research and health sciences**, v. 2, n. 6, p. 491-495, 2014.

SINGH, N. P., et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experimental Cell Research**, vol. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SUJATHA, K.; RAO, J.V.L.N S. A New RP-HPLC Method for the Estimation of Linagliptin In Tablet Dosage Forms. **Indo American Journal of Pharm Research**, v. 3, n. 10, p. 8376 - 8381, 2013.

TRADJENTA (linagliptina) [package insert]. Ridgefield, Conn: Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals, Inc; 2011.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **Validation of compendial methods, twenty-sixth revision, national formulary**, 21st ed. Rockville, md: the united states pharmacopeial convention inc.; 2003.

VALADARES, M.C.; CASTRO, N.C.; CUNHA, L.C. Synadenium umbellatum: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 4, p. 632 - 638 , 2007

VARAPRASAD, C. MD., RAMAKRISHNA, A and K. RP-HPLC method for simultaneous estimation of metformin and linagliptin in tablet dosage form. **Rasayan Journal of Chemistry**, v. 8, n. 4 p. 426 – 432, 2015.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO global health days**>World Health Day 2016: Beat diabetes Disponível em <<http://www.who.int/campaigns/world-health-day/2016/es/>>. Acesso em 6 de abril de 2016.