

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ALOGLIPTINA: CARACTERIZAÇÃO, ESTUDO DE COMPATIBILIDADE,
VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA E ESTUDO DE
ESTABILIDADE PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE**

Charise Dallazem Bertol

Porto Alegre, 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ALOGLIPTINA: CARACTERIZAÇÃO, ESTUDO DE COMPATIBILIDADE,
VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA E ESTUDO DE
ESTABILIDADE PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE**

Tese apresentada por Charise Dallazem
Bertol para obtenção do TÍTULO DE
DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Porto Alegre, 2017

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 08.03.2017, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Ana Maria Bergold
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Kristiane de Cassia Mariotti
Polícia Federal/RS

Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva
Universidade Federal de Santa Catarina

CIP - Catalogação na Publicação

Bertol, Charise Dallazem
ALOGLIPTINA: CARACTERIZAÇÃO, ESTUDO DE
COMPATIBILIDADE, VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
E ESTUDO DE ESTABILIDADE PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE
/ Charise Dallazem Bertol. -- 2017.
141 f.

Orientador: Pedro Eduardo Fröhlich.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2017.

1. alogliptina. 2. controle de qualidade. 3.
análise térmica. 4. validação de métodos analíticos.
5. estabilidade. I. Fröhlich, Pedro Eduardo, orient.
II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre comigo, e me dar forças em momentos de exaustão.

À toda a minha família (em especial ao meu filho Rafael, marido Josuel, mãe Regina) por compreender os momentos de ausência, pelo carinho, amor e afeto, e por me apoiar em todas as minhas decisões.

Ao meu orientador, Prof. Pedro, pela amizade, compreensão, e ensinamentos em todos os momentos que precisei.

Aos colegas do LAPS UFRGS pela amizade e assistência em momentos de apuros.

Aos colegas do laboratório de controle de qualidade da UFSC pela parceria em experimentos e por manter as portas sempre abertas.

Aos colegas da UPF, Maria Tereza Friedrich, Eliamar Cerasoli, Luciane Colla, pelo subsídio na execução deste trabalho.

À Universidade de Passo Fundo, em especial à Divisão de Pesquisa e Direção do ICB por conceder Licença parcial de Pós-graduação.

*“Se procurar bem você acaba encontrando.
Não a explicação (duvidosa) da vida,
Mas a poesia (inexplicável) da vida.
Mas se desejarmos fortemente o melhor e, principalmente, lutarmos pelo
melhor...O melhor vai se instalar em nossa vida.”*

Carlos Drummond de Andrade

Resumo

Alogliptina (ALG) é um hipoglicemiante oral, que inibe a enzima dipeptidil peptidase – 4 (DPP-4) com alta seletividade e aumenta a secreção de insulina prevenindo a hiperglicemia prandial. Como ALG não está descrita nas farmacopeias, este trabalho objetivou caracterizar a matéria-prima (Capítulo I), desenvolver métodos analíticos (Capítulo II) e avaliar sua estabilidade (Capítulo III), auxiliando no controle de qualidade. No capítulo I, a ALG foi caracterizada através de calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TGA) e microscopia eletrônica de varredura (SEM) acoplada a espectrômetro de raios X por dispersão de energia (EDS). A compatibilidade entre a ALG e os excipientes presentes nos comprimidos foi avaliada por DSC, TGA, infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raios-X de pó (XRPD) e microscopia com estágio de aquecimento. ALG apresentou pureza próxima a 99%, com faixa de fusão entre 179,4 e 187,2 °C (pico em 183,3 °C), seguida por decomposição que iniciou em 198,0 °C. Na SEM/EDS, os cristais de ALG mostraram-se predominantemente irregulares e foram detectados traços de impurezas (chumbo e cobre). Alterações na temperatura de fusão da ALG com manitol, estearato de magnésio e nos comprimidos comerciais foram observadas. A microscopia com aquecimento demonstrou que a interação entre manitol e ALG e nos comprimidos é devida à solubilização do fármaco no excipiente fundido, enquanto que na mistura com o estearato de magnésio é devida à fusão do excipiente e do fármaco que ocorrem separadamente, onde o excipiente funde antes que o fármaco. FTIR e XRPD das misturas não detectaram incompatibilidades, somente o aparecimento de bandas adicionais relacionadas aos excipientes. ALG foi compatível com todos os excipientes testados. Estes resultados são importantes para caracterizar, conhecer a estabilidade e a compatibilidade do fármaco. No capítulo II, foram desenvolvidos e validados métodos de cromatografia líquida (LC) indicativos de estabilidade utilizando dois detectores, ultravioleta (UV) e detector de aerossol carregado (CAD) para análise de ALG em comprimidos. Foi utilizada uma coluna C₈ (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) em modo isocrático, fluxo de 0,8 mL min⁻¹, utilizando acetonitrila e tampão acetato de amônio 10 mM pH 3,5 ajustado com ácido acético (90:10, v/v) como fase móvel e detecção no

UV em 275 nm. Os métodos foram lineares no intervalo de 25 - 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em ambos os detectores. Os limites de detecção foram de 2,65 e 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e os de quantificação de 8,84 e 20,85 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para UV e CAD. Os métodos foram precisos e exatos, com desvio padrão relativo menor que 3% e percentuais de recuperação próximos a 100%. Nenhum dos excipientes, ou produtos de degradação interferiu na detecção do fármaco durante os estudos de especificidade. No ensaio de robustez, pequenas alterações no fluxo de fase móvel, pH e concentração de solvente orgânico não afetou significativamente os resultados. O doseamento dos comprimidos obtido com ambos detectores não mostrou diferenças entre si. Os métodos podem ser considerados intercambiáveis e podem ser aplicados como ferramentas para o controle de qualidade de rotina de comprimidos de ALG. No capítulo III foi avaliada a estabilidade térmica da ALG utilizando TGA isotérmica e não isotérmica, e degradação em estufa, analisando as amostras por LC-UV. Na TGA isotérmica a ALG foi submetida a 150, 155, 160, 165, 170 °C, até perda de massa de 10% e os dados foram analisados pelo método de Arrhenius. Na TGA não isotérmica variaram-se as razões de aquecimento, utilizando 2,5, 5,0, 10,0 e 15,0 °C/min até 500 °C. Os dados foram analisados pelo método de Ozawa e de Kissinger. Na degradação em estufa o fármaco foi submetido as temperaturas de 130, 140, 150, 155, 160 e 170 °C. Os parâmetros cinéticos foram obtidos por Arrhenius. ALG segue degradação de zero ordem, onde a velocidade de degradação independe da concentração do reagente. A perda de massa está relacionada à perda química. Os parâmetros cinéticos variaram de acordo com o modelo matemático aplicado. A energia de ativação variou de 26 a 45 kcal/mol. O fármaco degradado demonstrou ser menos tóxico em ensaio de citotoxicidade em células CRIB do que o fármaco não degradado. Os métodos desenvolvidos e a caracterização realizada mostram-se úteis para o adequado controle de qualidade do fármaco.

Palavras-chaves: alogliptina, análise térmica, compatibilidade, LC-UV, LC-CAD

ALOGLIPTIN: CHARACTERIZATION, COMPATIBILITY STUDY, VALIDATION OF ANALYTICAL METHODOLOGY AND STABILITY STUDY FOR QUALITY ASSESSMENT

Abstract

Alogliptin (ALG) is an oral hypoglycemic agent, which inhibits the enzyme dipeptidyl peptidase - 4 (DPP-4) with high selectivity and increase insulin secretion, preventing postprandial hyperglycemia. ALG is not described in any pharmacopeia. In this context, this study aimed to characterize the active pharmaceutical ingredient (Chapter I), to developed assay methods (Chapter II) and to evaluate the stability (Chapter III), assuring the adequate quality control. In Chapter I, ALG was characterized by differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TGA) and scanning electron microscopy (SEM) coupled with energy dispersive spectrometer X-ray (EDS). The compatibility between ALG and the excipients present in the commercial tablets was evaluated by DSC, TGA, Fourier transform infrared (FTIR), X-ray powder diffraction (XRPD) and hot stage microscopy. ALG presented purity close to 99%, with a melting range between 179.4 to 187.2 °C (peak at 183.33 °C), followed by decomposition which began at 198 °C. In the SEM/EDS the crystals of ALG were predominantly irregulars and it were detected traces of impurities (lead and copper). Alterations in melting temperature of ALG with mannitol, magnesium stearate and in tablets were observed. The hot stage microscopy showed that the interactions between mannitol and ALG and in the tablets were due to the solubilization of the drug in the fused excipient, and in the mixture with magnesium stearate, it was due to the melting of the drug and excipient separately, where the excipient started the melting prior of the drug. FTIR and XRPD of the mixtures did not detect incompatibilities, only the appearance of additional bands related to the excipients. ALG was compatible with all excipients tested. These results are important to characterize, to know the drug stability and compatibility. In Chapter II, liquid chromatography (LC) methods indicative of stability were developed and validated using two detectors, ultraviolet (UV) and charged aerosol detector (CAD) for ALG

tablets. It was used a C₈ column (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) in isocratic mode, flow rate of 0.8 ml min⁻¹ using acetonitrile and ammonium acetate buffer 10 mM, pH 3.5 adjusted with acid acetic acid (90:10, v/v) as mobile phase and UV detection at 275 nm. The methods were linear in the range of 25 - 200 μg ml⁻¹ in both detectors. Limits of detection were 2.65 and 6.25 μg mL⁻¹, and of quantification were 8.84 and 20.85 μg mL⁻¹, respectively, for UV and CAD. The methods were accurate and precise, with a relative standard deviation lower than 3% and recovery close to 100%. None of the excipients or degradation products showed interference in the drug detection during specificity studies. In the robustness test, small changes in the mobile phase flow, pH and organic solvent concentration did not significantly affect the results. The results for tablets obtained with both detectors showed no differences. The methods may be considered interchangeable, and they can be used as tools for routine quality control of ALG tablets. In Chapter III the thermal stability of the ALG was evaluated using isothermal and non-isothermal TGA, as well as oven, and samples were analyzed by LC-UV. In the isothermal TGA the ALG was subjected to 150, 155, 160, 165, 170 °C until a mass loss of 10% and the data were analyzed by the Arrhenius method. In non-isothermal TGA the heating rates were varied using 2.5, 5.0, 10.0 and 15.0 °C/min until 500 °C. Data were analyzed by the Ozawa and Kissinger method. In oven the drug was subjected to 130, 140, 150, 155, 160, and 170 °C. The kinetic parameters were obtained by Arrhenius. ALG follows zero-order degradation, where the rate of degradation is independent of the concentration of any reagent. Mass loss is related to chemical reactions. The kinetic parameters varied according to the applied mathematical model. The activation energy ranged from 26 to 45 kcal / mol. The degraded drug was shown to be less toxic in cytotoxicity assay using CRIB cells than the non-degraded drug. The methods developed and the characterization performed proved to be useful for adequate quality control tests of the drug.

Keywords: alogliptin, thermal analysis, compatibility, LC-UV, LC-CAD

Lista de Figuras

Figura 3.1 Estrutura química do benzoato de alogliptina, A) R-isômero e B) S-isômero (RAO et al., 2014).	37
Figura 3.2 A) Sítio ativo da DPP-4 com resíduos importantes rotulados. B) Superfície do sítio ativo da DPP-4. C) Delineamento da estrutura baseada no esqueleto quinazolinona, demonstrando as modificações neste esqueleto (em C2, N3 e C4) e as interações chave com os aminoácidos da enzima DPP-4. D) Esqueleto quinazolinona inicial no sítio ativo da DPP-4. E) Esqueleto quinazolinona no sítio ativo da DPP-4 com as principais interações chave (FENG et al., 2007)	38
Figura 3.3 Metabólitos I (<i>N</i> -desmetilado) e II (<i>N</i> -acetilado) da ALG (CHRISTOPHER et al., 2008).	40
Figura 3.4 Rota de síntese do benzoato de ALG (ZHANG et al., 2015).	46
Figura 3.5 Estruturas de impurezas da ALG (Impureza C existe como o sal benzoato) (ZHANG et al., 2015).	47
Figura 3.6 Rota de síntese do benzoato de ALG e suas potenciais impurezas (ZHOU et al., 2014). (SMA = material de iniciação A: 6 - cloro - 3 - metiluracil; SMB = material de iniciação B: brometo de 2 - cianobenzil; SMC = material de iniciação C: (R) 3 - (boc-amino) piperidina; SMD = material de iniciação D: ácido benzoico).	49
Figura 3.7 Impurezas químicas da ALG (ZHOU et al., 2014)	50
Figura 3.8 Rota de síntese do benzoato de alogliptina proposto por Lu et al., 2016.	51
Figura 3.9 Cromatograma do estudo de degradação da ALG e metformina apresentado por (RUNJA; RAVIKUMAR; AVANAPU, 2016) nas condições A) ácida, B) básica, C) peróxido, D) térmica, E) fotolítica.	53
Figura 3.10 Cromatograma do estudo de degradação da ALG e metformina (SRI et al., 2013) nas condições A) térmica, B) ácida, C) básica, D) oxidativa, E) padrões dos fármacos.	54
Figura 3.11 Cromatograma do estudo de degradação da ALG apresentado por (ZHOU et al., 2014) nas condições A) sem degradação, B) ácida, C) básica, D) oxidativa, E) fotolítica (luz UV por 2 dias), F) térmica.	55
Figura 3.12 Cromatograma do estudo de degradação forçada da ALG (ZHANG et al., 2015) onde são apresentados em A) impurezas A, B, C, D, E, F e G; B) degradação ácida; C) degradação básica; D) aquecimento; E) luz F) degradação oxidativa. Os picos em 15 minutos e em 18 minutos são do benzoato e da ALG, respectivamente.	56
Figura 3.13 Cromatograma do estudo de degradação da ALG (LU et al., 2016) nas condições A) branco, B) solução de referência, C) ALG matéria-prima, D) ALG comprimidos, E) fotolítica, F) térmica, g) ácida, h) básica, i) oxidativa.	57
Figure 4.1 Chemical structure of alogliptin benzoate.	71
Figure 4.2 DSC (a) and DTGA/TGA (b/c) curves of ALG API under nitrogen atmosphere.	75

Figure 4.3 Purity determination of ALG API by DSC obtained at heating rate of 2 °C. min ⁻¹ under nitrogen atmosphere.	76
Figure 4.4 Scanning Electron Microscopic Photographs of ALG API (A, B) and tablets (C, D) at 60x and 1000x respectively.	77
Figure 4.5 Stacked overlay of DSC curves of physical mixtures: (a) ALG API; (b) ALG/ microcrystalline cellulose; (c) ALG/ HPC; (d) ALG/ croscarmellose sodium; (e) ALG tablet; (f) ALG/ magnesium stearate; (g) ALG/mannitol.	78
Figure 4.6 Stacked overlay of TGA curves of physical mixtures: (a) ALG API; (b) ALG/ microcrystalline cellulose; (c) ALG/ HPC; (d) ALG/ croscarmellose sodium; (e) ALG tablet; (f) ALG/ magnesium stearate; (g) ALG/mannitol.	79
Figure 4.7 FTIR spectrums of of physical mixtures: (a) ALG API; (b) ALG/ microcrystalline cellulose; (c) ALG/ HPC; (d) ALG/ croscarmellose sodium; (e) ALG tablet; (f) ALG/ magnesium stearate; (g) ALG/mannitol.	82
Figure 4.8 XRPD of a) mannitol; b) mixture ALG/ mannitol; c) ALG; d) mixture ALG/ magnesium stearate; e) magnesium stearate.	84
Figure 4.9 Hot stage microscopy. The melt of ALG was showed in “A”, before melt (A1), the sequence of melt process at 181.3 °C (A2 to A5) and after melt at 184 °C (A6). The mannitol is present in “B”, before (B1) and after (B2) melt at 165.3 °C. The binary mixture between ALG and mannitol are presented in “C”, before melt (C1), the start of melt at 154 °C (C2), during the melt at 165 °C (C3) and after the melt at 165 °C (C4). The tablets are presented in “D”, before melt (D1) and during the melt at 163.7 °C (D2) (400x magnification).	86
Figure 4.10 Hot stage microscopy. The binary mixture between ALG and magnesium stearate are presented, where A is before melt, B is the start of melt at 137 °C, and C is after the melt (at 178.9 °C). (100x magnification).	87
Figure 5.1 Chromatograms using (A) the CAD and (B) the UV detector (275 nm). 1 = ALG tablets 100 µg/mL, 2 = ALG API 100 µg/mL, 3 = placebo solution 100 µg/mL, 4 = benzoic acid 100 µg/mL, and 5 = mannitol 100 µg/mL. mAU, milli-absorbance unit.	98
Figure 5.2 Degradation of ALG API assessed by LC–CAD. (A) Acid hydrolysis (2 M formic acid, 235 h, 65°C); (B) basic hydrolysis (0.1 M ammonium hydroxide, 24 h, 25°C); (C) thermal hydrolysis (water, 235 h, 65°C); (D) oxidation (6% H ₂ O ₂ , 24 h, 25°C); and (E) photolysis (UV light at 352 nm, 15 days). 1 = ALG submitted to degradation conditions, 2 = blank solution, 3 = ALG without degradation, and X = degradation product.	98
Figure 5.3 Degradation of ALG API assessed by LC–UV at 275 nm. (A) Acid hydrolysis (2 M formic acid, 235 h, 65°C); (B) basic hydrolysis (0.1 M ammonium hydroxide, 24 h, 25°C); (C) thermal hydrolysis (water, 235 h, 65°C); (D) oxidation (6% H ₂ O ₂ , 24 h, 25°C); and (E) photolysis (UV light at 352 nm, 15 days). 1 = ALG submitted to degradation condition, 2 = blank solution, and 3 = ALG without degradation.	99

Figure 5.4 Pareto chart (Minitab 17) of standardized effects (response in assay, $\alpha = 5\%$) obtained for the robustness assay of ALG in tablets for (A) CAD and (B) UV detector.	99
Figura 6.1 Curvas termogravimétricas isotérmicas da ALG obtidas em 150, 155, 160, 165 e 170 °C sob atmosfera de nitrogênio.	110
Figura 6.2 Gráfico do logaritmo natural das constantes de velocidades de degradação em cada temperatura <i>versus</i> 1/temperatura (em °Kelvin) obtidos pelo método termogravimétrico isotérmico.	113
Figura 6.3 Gráfico do logaritmo natural do tempo para perder 10% de massa <i>versus</i> o inverso da temperatura (°K) obtidos a partir dos dados de curvas isotérmicas termogravimétricas.	113
Figura 6.4 Curvas TGA não isotérmicas obtidas utilizando diferentes razões de aquecimento, mostrando a perda de massa (%) <i>vs.</i> temperatura (c), o gráfico de Ozawa (obtido com o software TGA-5) (b) e o gráfico de Ozawa correlacionando a razão de aquecimento (β) e a temperatura do pico da primeira etapa de decomposição, obtida pela DTGA (a) da ALG.	115
Figura 6.5 Gráfico de Kissinger para o primeiro passo de decomposição da ALG, obtido a partir dos dados TGA não isotérmicos.	116
Figura 6.6 Teor (%) remanescente da ALG submetida à temperatura de 130 °C.	117
Figura 6.7 Teor (%) remanescente da ALG submetida às temperaturas de 140, 150, 155, 160 e 170 °C.	117
Figura 6.8 Gráfico do logaritmo natural das constantes de velocidade de degradação em cada temperatura <i>versus</i> o inverso da temperatura em °Kelvin obtidos pelo método de degradação em estufa e análise por LC-UV	118
Figura 6.9 Cromatogramas A) ALG sem degradação, ALG exposta a: B) 130 °C por 168 h (teor remanescente de cerca de 50%), C) 140 °C por 5 h (teor remanescente de cerca de 70%), D) 150 °C por 5 h (teor remanescente de cerca de 50%), E) 155 °C por 4 h (teor remanescente de cerca de 45%), F) 160 °C por 2,5 h (teor remanescente de cerca de 60%), G) 170 °C por 2 h teor remanescente de cerca de 50%). Pico 1 é o pico de degradação 1, e pico 2 é o pico de degradação 2.	120
Figura 6.10 Comparação do logaritmo natural das constantes de velocidades obtidas nas temperaturas de 150, 155, 160 e 165 °C pelo método em estufa e pelo método termogravimétrico isotérmico.	121
Figura 6.11 Estrutura química do benzoato de alogliptina, indicando a piperidina no anel 1, a pirimidina no anel 2 e a benzonitrila no anel 3.	126
Figura 6.12 Concentração citotóxica para 50% do cultivo celular (CC50%) da ALG não degradada e degradada.	127

Lista de tabelas

Tabela 3.1 Métodos analíticos e bioanalíticos por cromatografia líquida (LC) para a ALG.	43
Tabela 3.2 Condições de degradação forçada utilizadas para a ALG descritas na seção “especificidade” nos artigos.	52
Tabela 3.3 Sustâncias relacionadas (RS) (produtos de degradação e impurezas derivadas do processo de síntese) relacionadas ao fármaco e aos comprimidos de ALG propostas por (LU et al., 2016).	58
Table 4.1 Onset and peak temperatures of fusion and onset temperature of decomposition observed in the DSC and TGA curves of ALG and binary mixtures with excipients (1:1).	79
Table 4.2 The characteristic bands present in alogliptin benzoate observed in the FTIR spectrum.	83
Table 5.1 Factors and levels evaluated in the robustness of methods.	97
Table 5.2 Requirements assessed for the LC–UV and LC–CAD method validations.	97
Table 5.3 Repeatability/intermediate precision and accuracy of methods for determination of ALG tablet solutions prepared by ALG API addition.	99
Table 5.4 Robustness assay results of ALG tablets for the LC–CAD and LC–UV methods.	100
Tabela 6.1 Valores dos coeficientes de correlação obtidos, plotando-se os gráficos de zero (massa (%) x tempo (h)), primeira (logaritmo da massa (%) x tempo (h)), e segunda (1/massa (%) x tempo (h)) ordem em diferentes temperaturas.	111
Tabela 6.2 Características do comportamento térmico da primeira fase de degradação da ALG no método termogravimétrico não isotérmico.	115
Tabela 6.3 Valores dos coeficientes de correlação obtidos, plotando-se os gráficos de zero (concentração (%) x tempo (h)), primeira (logaritmo da concentração (%) x tempo (h)), e segunda (1/concentração (%) x tempo (h)) ordem em diferentes temperaturas.	118
Tabela 6.4 Compilação dos parâmetros cinéticos da degradação da ALG obtidos por diferentes métodos.	122

Sumário

1. INTRODUÇÃO	21
2. OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1 Desenvolvimento de Diabetes Melitus tipo 2 (DMT2)	33
3.2 Hormônios incretinas GLP-1 e GIP e inibidores DPP-4	34
3.3 Alogliptina (ALG)	36
3.3.1 Relação estrutura-atividade	37
3.3.2 Propriedades farmacocinéticas (PK) e farmacodinâmicas (PD)	38
3.4 Eventos adversos dos inibidores DPP-4	40
3.5 Métodos analíticos e bioanalíticos descritos para a ALG	42
3.6 Impurezas e substâncias relacionadas para a ALG	46
REFERÊNCIAS	61
4. CAPÍTULO I – Análise qualitativa: Caracterização físico-química da alogliptina	67
Physicochemical characterization of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor alogliptin	69
Abstract	69
4.1 Introduction	70
4.2 Materials and Methods	72
4.2.1 Materials	72
4.2.2 Thermo analytical characterization	72
4.2.3 Scanning electron microscopy/ Energy Dispersive X-ray Spectrometer (SEM/ EDS)	73
4.2.4 Compatibility studies	73
4.3 Results and Discussion	74
4.3.1 Thermo analytical characterization	74
4.3.2 Purity determination	75
4.3.3 Scanning electron microscopy (SEM)	76
4.3.4 Compatibility studies	78
4.4 Conclusion	87
REFERENCES	88
4.5 Anexo 1: Comprovante de submissão	91
5. CAPÍTULO II – Análise quantitativa: Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para avaliação de alogliptina em comprimidos por LC-UV e LC-CAD	93
Artigo publicado no periódico <i>Journal of AOAC International</i> .	
5.1 Introduction	95
5.2 Materials and Methods	95
5.2.1 Materials	95
5.2.2 Preparation of Solutions	96
5.2.3 LC instrumentation and Chromatographic Conditions	96

5.2.4 Validation	96
5.2.4.1 Linearity, Limit of detection (LD) and Limit of quantitation (LQ)	96
5.2.4.2 Specificity	96
5.2.4.3 Precision and Accuracy	96
5.2.4.4 Robustness	96
5.2.4.5 Methods Comparison	97
5.3 Results and Discussion	97
5.3.1 Method Validation	97
5.3.1.1 Optimization of Chromatographic Conditions	97
5.3.1.2 Linearity, LD and LQ	97
5.3.1.3 Specificity	97
5.3.1.4 Precision and Accuracy	98
5.3.1.5 Robustness	98
5.3.1.6 Methods Comparison	99
5.4 Conclusions	99
REFERENCES	100
6. CAPÍTULO III – Estudo de estabilidade térmica do fármaco ALG	101
6.1 Introdução	103
6.2 Materiais e Métodos	106
6.2.1 Cinética de degradação isotérmica e não isotérmica por termogravimetria	106
6.2.1.1 Isotérmica	107
6.2.1.2 Não isotérmica	107
6.2.2 Degradação em estufa e análise por LC-UV	107
6.2.2.1 Condições cromatográficas	108
6.2.3 Citotoxicidade do fármaco não degradado e degradado	108
6.3 Resultados e Discussão	109
6.3.1 Cinética termogravimétrica isotérmica	110
6.3.2 Cinética termogravimétrica não isotérmica	114
6.3.3 Degradação em estufa e análise por LC-UV	116
6.3.4 Citotoxicidade do produto de degradação em células CRIB	126
6.4 Conclusão	127
REFERÊNCIAS	128
7 DISCUSSÃO GERAL	133
8 CONCLUSÕES	139

1. INTRODUÇÃO

Diabetes é uma doença crônica que afeta diversas rotas fisiológicas que buscam a homeostase glicêmica (RICHARD; SHELBURNE; KIRK, 2011). A Organização Mundial da Saúde estimou que, durante 2005 1,1 milhões de pessoas morreram de complicações relacionadas à hiperglicemia. *Diabetes Melitus* tipo 2 (DMT2) é responsável por 90% de todos os casos de diabetes (GERICH, 2010). As complicações relacionadas ao DMT2, como cegueira, amputação, doença renal e cardiovascular, implicam em sofrimento e gastos elevados. Modificações no estilo de vida auxiliam no tratamento do DMT2, entretanto os pacientes não alcançam níveis glicêmicos adequados sem intervenção farmacológica, que retorna a glicose sanguínea próxima à normalidade, aliviando os sintomas e minimizando o risco de complicações a longo prazo (BARNETT, 2011).

A maioria dos fármacos disponíveis para o tratamento do DMT2 apresenta eventos adversos, o que reduz a adesão ao tratamento aumentando a morbidade e a mortalidade associada à doença. Os fármacos moduladores do sistema incretina, entre estes os agonistas do peptídeo-1 semelhante ao glucágon (GLP-1) e os inibidores seletivos da enzima dipeptidil peptidase-4 (DPP-4), podem auxiliar na melhora dessa realidade (GERICH, 2010).

Células enteroendócrinas no epitélio gastrointestinal secretam mais de 20 peptídeos, incluindo as incretinas: GLP-1 e peptídeo insulínico dependente de glicose (GIP). As incretinas estimulam a secreção de insulina prevenindo a hiperglicemia prandial (GERICH, 2010; HANNA et al., 2012). No plasma, GLP-1 é rapidamente inativado pela enzima DPP-4, que é uma enzima localizada na superfície celular de diversos tecidos. As incretinas respondem às flutuações de glicose na corrente circulatória de uma forma dependente da glicose, onde o GLP-1 estimula a liberação de insulina pelas células β pancreáticas, e inibe a secreção de glucágon; por isso este efeito é considerado como um mecanismo de *feedback* (RICHARD; SHELBURNE; KIRK, 2011).

A alogliptina (ALG) é um hipoglicemiante oral, com uma estrutura química baseada na quinazolinona, que inibe não covalentemente a enzima DPP-4 com alta seletividade e afinidade. Estudos revelam que ALG exibe seletividade para a enzima DPP-4 maior que 10.000 vezes em relação à DPP-8 e DPP-9 (FENG et al., 2007). Essa

seletividade é importante, pois a inibição de DPP-8 e DPP-9 pode levar à toxicidade em múltiplos órgãos em ratos e cães e atenuação da ativação de células- T humanas *in vitro*. Em ratos, inibidores DPP-8 e DPP-9 produziram alopecia, trombocitopenia, reticulocitopenia, aumento do baço, mudanças histopatológicas em múltiplos órgãos e mortalidade. Em cães, estes inibidores produziram toxicidade gastrointestinal (LANKAS et al., 2005). A inibição da enzima DPP-4 leva à inibição da degradação do GLP-1 e GIP endógenos (incretinas), potencializando o efeito destes hormônios (NEUMILLER; SETTER, 2012).

ALG apresentou um perfil farmacocinético, farmacodinâmico, e farmacológico seguro e favorável em estudos pré-clínicos e clínicos (CHRISTOPHER et al., 2008; COVINGTON et al., 2008; FENG et al., 2007; LEE et al., 2008; MORITOH et al., 2008). Além disso, uma única dose de ALG melhorou significativamente a secreção de insulina e a tolerância à glicose em ratos Wistar obesos (FENG et al., 2007).

No enfoque de controle de qualidade, a análise de produtos farmacêuticos deve estar inserida em todas as etapas produtivas, desde a matéria-prima e insumos até o produto acabado, visando a garantir produtos que satisfaçam às normas de identidade, pureza e atividade. Produtos farmacêuticos que apresentem uma inadequada qualidade podem desencadear reações de toxicidade e/ou ineficácia terapêutica. Dessa forma, devem ser avaliados aspectos como identificação e quantificação da substância ativa, identificação e determinação de impurezas, produtos de degradação, e verificação da estabilidade da substância ativa na formulação (WATSON, 2005).

A ALG foi descoberta em 2007 (FENG et al., 2007), aprovada no Japão em 2010, pelo *Food and Drug Administration* (FDA, 2013a) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em 2013. Em Setembro de 2014, estava disponível em mais de 39 países (BRASIL, 2016; SAICHO, 2015; SMERP, 2016). Recentemente, a ANVISA aprovou o registro de comprimidos contendo benzoato de alogliptina em associação com metformina (Nesina Met®, Takeda, aprovado em 2015) e pioglitazona (Nesina Pio®, Takeda, aprovado em 2016). Suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas já estão bem fundamentadas na literatura, com diversos trabalhos descrevendo suas características *in vivo*.

Fármacos recém-lançados no mercado são fontes de investigação por diversos grupos de pesquisa no mundo, inclusive quando se trata do desenvolvimento de métodos analíticos. Alguns trabalhos disponíveis na literatura para este fármaco descrevem rotas de síntese, impurezas e produtos de degradação relacionados ao fármaco, de uma forma bem caracterizada. Porém, outros trabalhos apresentam métodos analíticos contendo validação incompleta, normalmente sem os estudos de especificidade. Os estudos que contemplam os ensaios de especificidade apresentam resultados diferentes, em condições de degradação diferentes (tabela 3.1, pg 23). Nesse contexto, percebe-se a necessidade de novos métodos analíticos em relação ao fármaco ALG.

Este fármaco não está descrito nas Farmacopeias, e por isso, faz-se necessária a caracterização quali e quantitativa detalhada do fármaco na forma de matéria-prima e de comprimidos, e o desenvolvimento de novos métodos de análise, assim como, o estudo de compatibilidade fármaco-excipiente. Este trabalho contemplou também a avaliação da estabilidade térmica da matéria-prima, determinando os principais parâmetros cinéticos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar, avaliar a compatibilidade e a estabilidade, desenvolver e validar métodos de análise que subsidiem o adequado controle de qualidade da ALG.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a ALG matéria-prima utilizando calorimetria exploratória diferencial (DSC), termogravimetria (TGA), difração de raio-X de pó (XRPD), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);
- Avaliar a compatibilidade fármaco:excipientes utilizando as técnicas de DSC, TGA, XRPD, FTIR e microscopia acoplada a aquecimento;
- Desenvolver métodos para a análise quantitativa da ALG matéria-prima e comprimidos por cromatografia líquida de alta eficiência (LC) utilizando detectores de UV e CAD;
- Submeter a ALG matéria-prima a condições de estresse como hidrólise ácida e básica, fotólise, calor e oxidação, a fim de verificar os fatores envolvidos na degradação;
- Realizar estudo de estabilidade da ALG matéria-prima por TGA (método isotérmico e não isotérmico) e em estufas e análise por LC-UV.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Desenvolvimento de Diabetes Melitus tipo 2 (DMT2)

DMT2 é uma desordem metabólica e endócrina complexa crônica, que afeta diversas rotas fisiológicas que buscam a homeostase glicêmica. As interações entre fatores genéticos e ambientais, incluindo falta de atividade física, qualidade e quantidade de nutrientes, puberdade e idade, que podem promover a adiposidade, resultam em uma desordem progressiva e heterogênea com vários graus de resistência à insulina (redução da resposta dos tecidos periféricos ao hormônio) e disfunção de células β pancreáticas (redução de insulina circulante). Normalmente, a insulina se liga a receptores especiais nas superfícies celulares e inicia uma série de reações envolvidas no metabolismo da glicose. No diabetes, as reações intracelulares estão diminuídas, tornando a insulina menos efetiva na estimulação da captação da glicose pelos tecidos. Sobrepeso e obesidade são os maiores contribuintes no desenvolvimento de tolerância à glicose prejudicada (fase inicial pré-diabetes) e resistência à insulina (BRUNTON et al., 2012; RICHARD; SHELBURNE; KIRK, 2011; SMELTZER; BARE, 2002; TAHRANI et al., 2011).

Quando células β não secretam insulina suficiente para superar a resistência à insulina, a tolerância diminuída à glicose progride para o DMT2 (TAHRANI et al., 2011). Tipicamente, em pacientes diagnosticados com DMT2 a função das ilhotas já diminuiu cerca de 50%. A redução da massa de células β é devida, em grande parte, à apoptose acelerada (GERICH, 2010).

Por causa das alterações fisiopatológicas variáveis e progressivas associadas com DMT2, compostos farmacológicos com diferentes mecanismos de ação são necessários em diferentes estágios da doença. Entretanto estes compostos têm limitações e efeitos adversos ocasionando baixa adesão ao tratamento. Entre as limitações, as melhoras iniciais no controle da glicemia não são sustentadas devido à disfunção progressiva das células β (GALLWITZ et al., 2012; GERICH, 2010; TAHRANI et al., 2011).

Para minimizar as complicações micro e macrovasculares, morbidade e mortalidade associada a diabetes, os pacientes devem monitorar os níveis glicêmicos e

a hemoglobina glicada (HbA1c), que deve permanecer inferior a 7% (GALLWITZ et al., 2012; IDF, 2012; RYDÉN et al., 2007).

3.2 Hormônios incretinas GLP-1 e GIP e inibidores DPP-4

No epitélio gastrintestinal células enteroendócrinas secretam mais de 20 peptídeos que influenciam a motilidade intestinal, reparo epitelial, adiposidade, regulação do apetite, e homeostase da glicose, incluindo as incretinas peptídeo-1 semelhante ao glucágon (GLP-1) e peptídeo insulínico glicose-dependente (GIP). As incretinas estimulam a secreção de insulina prevenindo a hiperglicemia prandial (GERICH, 2010; HANNA et al., 2012).

Diversos nutrientes (como carboidratos e lipídeos) estimulam a liberação de incretinas de células especializadas no epitélio intestinal, que resulta em estimulação da secreção de insulina. Estas células intestinais liberam entre 10 e 15% da forma ativa do GLP-1 na circulação sistêmica e o restante permanece no lúmen intestinal. As concentrações plasmáticas de GLP-1 e GIP aumentam dentro de 5-15 min após uma refeição (GERICH, 2010; HANNA et al., 2012). O efeito da incretina pode ser considerado como um mecanismo de *feedback* que responde às flutuações de glicose na corrente circulatória (RICHARD; SHELBURNE; KIRK, 2011).

Essa rápida secreção está relacionada à combinação de sinais endócrinos e neuronais. Na mucosa intestinal, neurônios sensíveis à glicose ativam aferentes vagais inervando áreas do SNC, incluindo o hipotálamo. Esta rota mediada por incretinas responde por até 70% da secreção de insulina estimulada pela glicose em indivíduos saudáveis (AHRÉN, 2011; HANNA et al., 2012).

Além da estimulação da secreção da insulina pelas células β do pâncreas, GLP-1 reduz a secreção do glucágon, e retarda o esvaziamento gástrico, levando a uma diminuição na ingestão de alimentos. O efeito incretina é reduzido em DMT2, pois há uma diminuição da capacidade de resposta das células β à ação insulínica do GIP devido à redução da massa destas células; entretanto a secreção e atividade do GLP-1 são mantidas, tornado o GLP-1 um alvo promissor para o tratamento de DMT2 (AHRÉN, 2011; GERICH, 2010; HANNA et al., 2012).

A dipeptidil peptidase-4 (DPP-4) é uma serina peptidase (protease) localizada na superfície celular do corpo, que circula no plasma. Esta enzima é expressa na maioria dos tecidos e é encontrada em altas concentrações na medula óssea, trato gastrintestinal, trato biliar e rins. Também é encontrada no fígado, pâncreas, placenta, próstata, células epiteliais e endoteliais, timo, baço, células mieloides e linfoides (NEUMILLER; SETTER, 2012; RICHARD; SHELBURNE; KIRK, 2011). DPP-4 cliva peptídeos através da remoção das sequências N-terminal (depois do penúltimo aminoácido prolina ou alanina), rapidamente degradando GLP-1 e GIP, tornando-os inativos, sendo a meia-vida plasmática das incretinas de cerca de 2 min (GERICH, 2010; RICHARD; SHELBURNE; KIRK, 2011).

Agentes terapêuticos que aumentam a liberação endógena das incretinas ou reforçam sua resposta como os agonistas GLP-1 resistentes à DPP-4 e os inibidores DPP-4 auxiliam na modulação da glicose e controlam a hiperglicemia em DMT2. Atualmente, a *European Medicines Agency* (EMA) e o FDA aprovaram os inibidores da DPP-4 para o uso. Os guias *National Institute for Health and Clinical Excellence* e *German Diabetes Association* recomendam a inclusão dos inibidores DPP-4 em monoterapia ou em adição a outros hipoglicemiantes orais (GERICH, 2010).

A inibição da DPP-4 impede a inativação do GLP-1 e prolonga a ação das incretinas liberadas endogenamente, regulando a liberação de insulina pelas células β , reduzindo os níveis de glicose (AHRÉN, 2011; RICHARD; SHELBURNE; KIRK, 2011). Além disso, os inibidores DPP-4 estão associados ao aumento da função das células β e ao aumento da sensibilidade à insulina em humanos (BARNETT, 2011), ao contrário das sulfoniluréias e da metformina que em estudos pré-clínicos, não protegeram as células β da apoptose, não atenuando o declínio na função das ilhotas do pâncreas, característico de DMT2 (GERICH, 2010; AHRÉN, 2011).

O mecanismo de ação dos inibidores DPP-4 é distinto de outros hipoglicemiantes orais. Embora eles não sejam mais potentes em diminuir a glicose sanguínea e a HbA1c, eles apresentam vantagens clínicas relevantes, como risco negligenciável de hipoglicemia e inalteração de peso corporal, podendo ser utilizados em monoterapia ou em associação (SCHEEN, 2012).

Todos os inibidores do DPP-4 têm o mesmo mecanismo de ação, entretanto apresentam diferenças estruturais que tornam diferentes suas características farmacocinéticas e potência farmacológica (GERICH, 2010).

3.3 Alogliptina (ALG)

Benzoato de alogliptina (figura 3.1) é conhecido quimicamente por monobenzoato de 2-[[6- [(3*R*)-3-amino-1-piperidinil]-3,4-diidro-3-metil-2,4-dioxo-1(2*H*)-pirimidinil] metil] benzonitrila. Tem estrutura baseada na quinazolinona (FENG et al., 2007), com fórmula molecular de $C_{18}H_{21}N_5O_2 \cdot C_7H_6O_2$ e massa molar de 461,51 g/mol (base livre: 339,39 g/mol). É um pó branco a quase branco com ponto de fusão de cerca de 182,5 °C seguido por decomposição (FDA, 2013b). O fármaco contém um centro quiral, com configuração estereoquímica R (*in vivo* não há nenhuma ou praticamente nenhuma conversão ao enantiômero S) (FDA, 2013c). O isômero-S da ALG foi encontrado em menos de 0,5% (m/m) em três diferentes lotes de matérias-primas de benzoato de ALG (RAO et al., 2014). Apresenta moderada solubilidade em água (19,2 mg/mL) e em metanol, fracamente solúvel em etanol, solúvel em dimetil sulfóxido, e altamente solúvel em soluções aquosas a 37°C. O pKa da base protonada é 8,5 (FDA, 2013c). De acordo com a classificação biofarmacêutica, benzoato de ALG tem alta solubilidade com 47,0, 27,1, 27,6 e 21,9 mg/mL dissolvidos em HCl 0,1 mol/L, HCl 0,01 mol/L, tampão acetato pH 4,5 e tampão fosfato pH 6,8, respectivamente (FDA, 2013d). Para um fármaco ser considerado altamente solúvel, a maior dose deve dissolver em menos de 250 mL de água em uma faixa de pH de 1-7,5 (CHAVDA; PATEL; ANAND, 2010; FDA, 2016). No caso da ALG, a solubilidade excede, por exemplo, as condições *sink* necessárias para um ensaio de dissolução (pelo menos 0,083 mg/mL em um volume de 900 mL de meio, para uma dose de 25 mg) (FDA, 2013d).

Em janeiro de 2013, a ALG foi aprovada pelo FDA para o tratamento de DMT2. Nos EUA está disponível comercialmente na forma de comprimidos revestidos de liberação imediata para tratamento em monoterapia (Nesina®) nas doses de 6,25, 12,5 ou 25 mg, ou em associação a outros hipoglicemiantes como metformina

(Kazano®) e pioglitazona (Oseni®) (FDA, 2013b). No Brasil, temos o tratamento em monoterapia (Nesina®) e em associação com metformina (Nesina Met®) e pioglitazona (Nesina Pio®) (BRASIL, 2016).

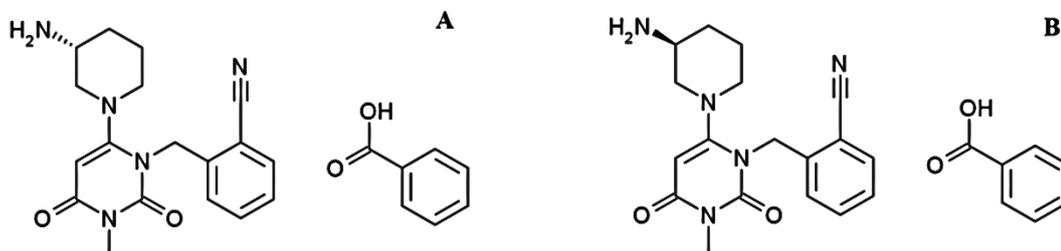


Figura 3.1 Estrutura química do benzoato de alogliptina, A) R-isômero e B) S-isômero (RAO et al., 2014).

3.3.1 Relação estrutura-atividade

Feng e colaboradores (2007) elucidaram o sítio ativo da enzima DPP-4, e descrevem onde um fármaco com estrutura baseada na quinazolinona se ligaria (figura 3.2). O esqueleto quinazolinona está presente em produtos naturais bioativos e fármacos, e por isso, os autores ponderaram que este esqueleto provavelmente impactaria positivamente nas propriedades desses inibidores. O anel aminopiperidina no carbono 2 (C2) foi previsto para prover a ponte salina com o ácido glutâmico (Glu 205/ 206), enquanto o grupo cianobenzil no nitrogênio 3 (N3) poderia preencher efetivamente o sítio S1 e interagir com a arginina (Arg 125). O carbonil em C4 forma uma importante ponte de nitrogênio com o NH da tirosina (Tyr 631), e o heterociclo bicíclico foi previsto para a ligação dupla com a tirosina (Tyr 547) (figura 2C). Modificações na estrutura deste esqueleto inicial foram sendo realizadas para obtenção das melhores propriedades farmacocinéticas (PK) e farmacodinâmicas (PD). Este esqueleto quinazolinona inicial apresentava curta meia-vida em ratos, devido à oxidação do anel fenila. Para chegar até a ALG, os autores realizaram modificações nos substituintes da quinazolinona e após alteraram este esqueleto com outros heterociclos. Entre as estratégias, foi detectado que o anel fenila da quinazolinona

poderia ser eliminado sem a perda da inibição da DPP-4; então substituíram a quinazolinona pela pirimidinodiona resultando na ALG.

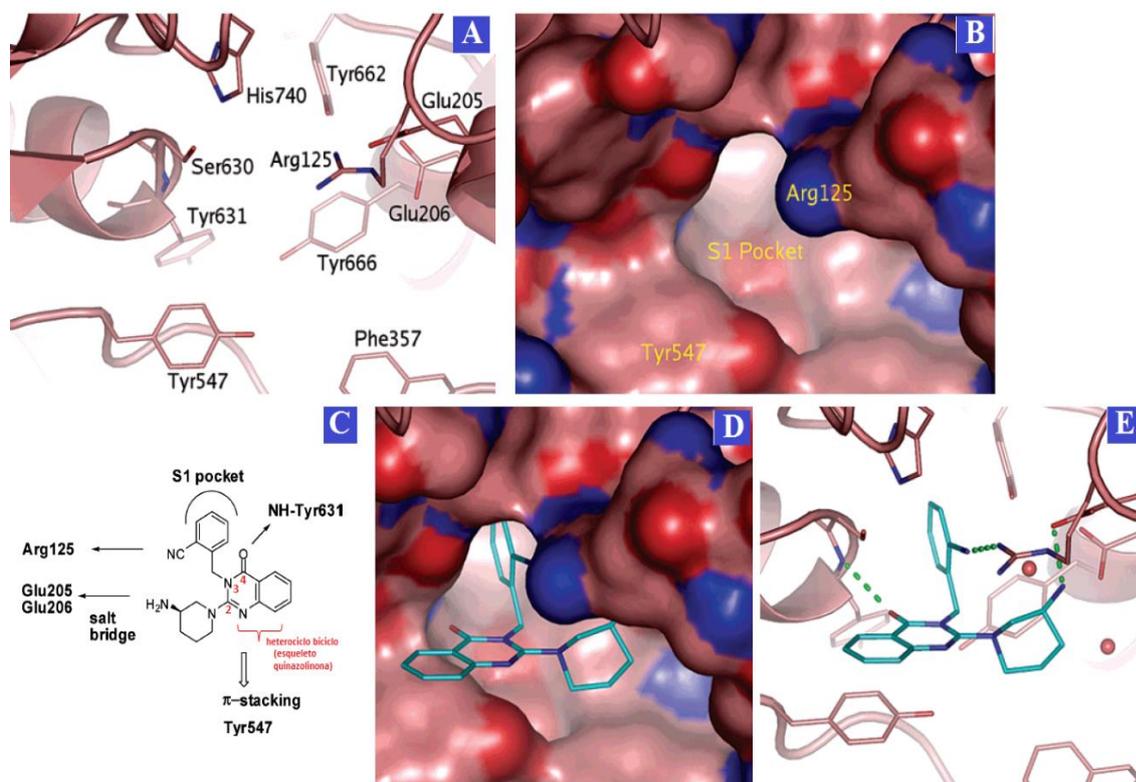


Figura 3.2 A) Sítio ativo da DPP-4 com resíduos importantes rotulados. B) Superfície do sítio ativo da DPP-4. C) Delineamento da estrutura baseada no esqueleto quinazolinona, demonstrando as modificações neste esqueleto (em C2, N3 e C4) e as interações chave com os aminoácidos da enzima DPP-4. D) Esqueleto quinazolinona inicial no sítio ativo da DPP-4. E) Esqueleto quinazolinona no sítio ativo da DPP-4 com as principais interações chave (FENG et al., 2007).

3.3.2 Propriedades farmacocinéticas (PK) e farmacodinâmicas (PD)

As propriedades PK da ALG foram estudadas em pacientes saudáveis e com DMT2 em doses de até 800 mg. O pico plasmático máximo ocorreu em 1 a 2 h após a administração. A ALG apresenta biodisponibilidade oral de aproximadamente 100% e a administração com alimentos não altera sua absorção. Em pacientes com DMT2 que receberam doses de até 400 mg uma vez por dia por 14 dias, o acúmulo de ALG foi mínimo com um aumento na concentração plasmática máxima (C_{max}) e na área sob a

curva (ASC) de 9 e 34 %, respectivamente. Após administração intravenosa apresentou volume de distribuição de 417 L, indicando que o fármaco é bem distribuído nos tecidos, e cerca de 20% de ligação às proteínas plasmáticas. Na dose clínica recomendada de 25 mg, ALG foi eliminada lentamente (meia-vida de eliminação: 12,4 a 21,4h) via excreção urinária (60 a 71% de fármaco), e via fezes (13% de fármaco). A C_{max} e a ASC aumentaram proporcionalmente com a dose. Os metabólitos MI (*N*-desmetilado – metabólito ativo inibidor DPP-4) e MII (*N*-acetilado – não ativo) (figura 3.3) representaram menos de 2% e 6%, respectivamente, em plasma e urina e por isso não são considerados relevantes. O metabolismo representa somente uma pequena parte da eliminação da ALG, que é principalmente excretada via renal. A depuração renal foi de 9,6 L/h e indica alguma secreção tubular ativa, enquanto a depuração sistêmica foi de 14,0 L/h (CHRISTOPHER et al., 2008; COVINGTON et al., 2008; FDA, 2013b).

No estudo de Christopher e colaboradores (2008) foi administrado o fármaco R-ALG com pureza quiral de 99,88% contendo cerca de 0,12% da forma S-ALG e, *in vivo*, foi detectado cerca de 0,1% da forma S-ALG. Dessa forma, a proporção da S-ALG detectada no plasma foi praticamente a mesma que a administrada, sugerindo que *in vivo* a conversão da forma R-ALG para a forma S-ALG é negligenciável.

A eficácia da ALG foi avaliada em pacientes DMT2 através da medição da glicose pós-prandial (4 h), concentrações de insulina, hemoglobina glicosilada (HbA1c), peptídeo-C e os valores de frutossamina. O pico de inibição média da DPP-4 variou de 94 a 99%. Houve redução da glicose pós-prandial no 14º dia que variou de –32,5 mg/dL até –65,6 mg/dL nas doses de 25 mg e 400 mg, respectivamente. Houve diminuição significativa na HbA1c no 15º dia de 0,22 % utilizando 25 mg de ALG, de 0,40% utilizando 100 mg e de 0,28% utilizando 400 mg comparada com o placebo (+0,05%). Diminuições significativas nas concentrações médias de frutossamina no 15º dia foram observadas com doses de 100 mg (–25,6 µmol/L) e 400 mg (–19,9 µmol/L) (COVINGTON et al., 2008; FDA, 2013b).

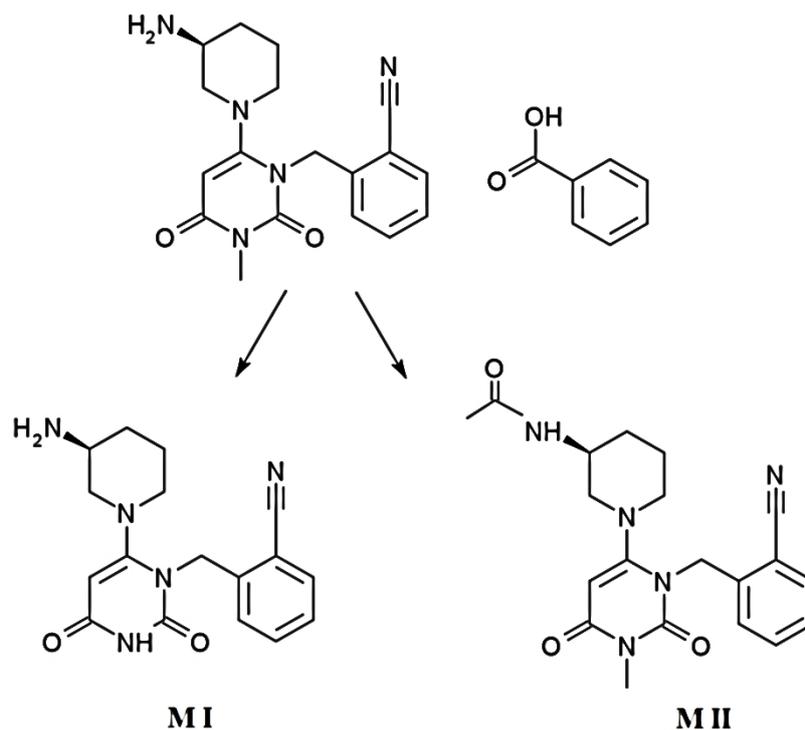


Figura 3.3 Metabólitos I (*N*-desmetilado) e II (*N*-acetilado) da ALG (CHRISTOPHER et al., 2008).

Estudos revelam que ALG exibe seletividade maior que 10.000 vezes para a enzima DPP-4 em relação a DPP-8 e DPP-9 (FENG et al., 2007). Essa alta seletividade para a enzima DPP-4 é importante característica para esta classe de fármacos, pois inibidores das enzimas DPP-8/ DPP-9 estão associados à reações de toxicidade em múltiplos órgãos (LANKAS et al., 2005).

A ALG não inibe e nem induz o sistema CYP nas doses clínicas recomendadas, não apresentando potenciais interações com outros fármacos metabolizados por este sistema (FDA, 2013b).

3.4 Eventos adversos dos inibidores DPP-4

Nos estudos clínicos, a ALG foi bem tolerada em todas as doses testadas sem nenhum relato de evento adverso sério e nenhum paciente descontinuou o tratamento devido aos eventos (CHRISTOPHER et al., 2008; COVINGTON et al., 2008).

Em pacientes saudáveis que receberam doses de até 800 mg de ALG (total de 36 pacientes), hipoglicemia (assintomática) foi relatada em 5 pacientes (1 recebeu 50 mg, 2 receberam 200 mg, 1 recebeu 400 mg e 1 recebeu o placebo). Outros eventos como tonturas (ALG 100 mg), síncope (ALG 200 mg), constipação (ALG 200 mg), infecção viral (ALG 400 mg), rubor (placebo) e náusea (placebo) foram relatados (CHRISTOPHER et al., 2008).

Em pacientes com DMT2, o evento mais comum foi dor de cabeça com a dose de 400 mg (em 6 de 16 pacientes) (comparado com 0/15 para 25 mg, 1/14 para 100 mg e 3/11 para o placebo) e tonturas em 4 de 16 pacientes (comparados com 1/15 para 25 mg, 2/14 para 100 mg, e 1/11 para o placebo). A incidência de hipoglicemia foi baixa, e nenhum episódio severo foi relatado (COVINGTON et al., 2008).

Em pacientes com DMT2 e síndrome coronariana aguda recente, ALG foi semelhante ao placebo em diminuir o risco de insuficiência cardiovascular, infarto do miocárdio, ou acidente vascular encefálico (WHITE et al., 2013). Além disso, não aumentou o risco de insuficiência cardíaca, incluindo morte cardiovascular e admissão hospitalar por insuficiência cardíaca (ZANNAD et al., 2015).

Inibidores DPP-4 não alteram o peso corporal. Em contraste, o uso de tiazolidinonas está associado ao ganho de peso, edema periférico e potenciais efeitos cardiovasculares, enquanto as sulfonilureias produzem hipoglicemia e aumento de peso e a metformina produz distúrbios gastrintestinais (GALLWITZ et al., 2012; GERICH, 2010; TAHRANI et al., 2011).

O efeito dos inibidores DPP-4 na cicatrização, inflamação e infecção representa outro ponto de diferenciação entre os hipoglicemiantes orais. Pacientes diabéticos apresentam risco aumentado para desenvolver infecções e dificuldades na cicatrização de feridas, pois suas feridas crônicas são caracterizadas pela superexpressão de citocinas e invasão de células inflamatórias. Os inibidores DPP-4 inibem a proliferação de células T e expressão de citocinas *in vitro* (GERICH, 2010).

Casos de pancreatite aguda e crônica foram relatados para agonistas GLP-1 e inibidores DPP-4 em estudos clínicos e vigilância pós-comercialização. Embora pouco frequentes, o paciente deve estar ciente do risco e observar sintomas como náusea

persistente, vômito e dor abdominal. Em muitos casos há outros fatores associados como pedras na vesícula, hipertrigliceridemia e abuso de álcool (HANNA et al., 2012).

3.5 Métodos analíticos e bioanalíticos descritos para a ALG

Alguns métodos analíticos e bioanalíticos estão disponíveis na literatura para o doseamento da ALG, conforme descrito na tabela 3.1.

Tabela 3.1 Métodos analíticos e bioanalíticos por cromatografia líquida (LC) para a ALG.

Referência	Matriz	Amostra	Fase estacionária	Fase móvel	Deteção	Intervalo de linearidade
(CHRISTOPHE R et al., 2008)	Plasma, urina Método de extração: Para ALG, MI e MII: Ppt com ACN Para S-ALG: ELL com acetato de etila: hexano (90:10 v/v)	ALG, MI, MII, S-ALG	ALG, MI e MII: Pré-coluna C18 (4 x 3 mm), coluna C18 (50 x 2 mm) S-ALG: coluna quiral (150 x 2 mm)	ALG, MI e MII: ácido fórmico 0,1% e ácido fórmico 0,1% em acetonitrila (eluição gradiente) S- ALG: acetato de amônio 2,5 mmol/L e 50 µmol/L, EDTA em água pH 6,0 (ajustado com ácido acético) e metanol 75:25 (v/v)	MS/MS Ionização positiva	Plasma ALG: 1 - 1000 ng/mL MI: 0,1 - 100 ng/mL MII: 0,1 - 50 ng/mL S-ALG: 0,2 – 50 ng/mL Urina: 5 – 5000 ng/mL (ALG, MI, MII) LQ: primeiro ponto da curva
(EL-BAGARY; ELKADY; AYOUB, 2012)	Matéria-prima e comprimidos	ALG	Coluna RP ciano (150 x 4,6 mm, 5 µm)	Tampão fosfato de potássio pH (4,6): ACN (20:80, v/v) Fluxo: 1 mL/min	UV, 215 nm	5 - 160 µg/mL LQ: 3,6 µg/mL
(KUMAR et al., 2013)	Comprimidos	ALG, MET	Coluna C18 (250 x 4,5 mm, 5 µm)	Trietilamina 0,2% pH 6,0: metanol (30:70 v/v) Fluxo: 1,0 mL/min	UV, 254 nm	25 - 150 µg/mL LQ ALG: 1,5 µg/mL MET: 2,2 µg/mL
(SRI et al., 2013)	Comprimidos	ALG, MET	Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Tampão fosfato de potássio (pH 4,0): ACN (70:30 v/v) Fluxo: 1 mL/min	PDA, 235 nm	ALG: 7,5 - 17,5 µg/mL (LQ: 0,2 µg/mL) MET: 300 - 700 µg/mL (LQ: 0,57 µg/mL)
(RAO et al., 2014)	Enantiômeros	ALG, S-ALG	Coluna quiral de celulose (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Etanol: dietilamina (100:0,5, v/v) Fluxo: 1,0 mL/min	UV, 230 nm	0,05 – 1,50 µg/mL LQ: S-ALG: 0,035 µg/mL
(REDDY; RAO; SARASWATHI, 2014)	Matéria-prima e comprimidos	ALG	Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Metanol: ACN: tampão acetato (80:10:10, v/v/v) Fluxo: 1,0 mL/min	UV, 280 nm	20 – 120 µg/mL

Referência	Matriz	Amostra	Fase estacionária	Fase móvel	Deteção	Intervalo de linearidade
(YADAV; JADHAV; MOHITE, 2014)	Matéria-prima comprimidos	ALG	Coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5µm)	Metanol: água (80:20, v/v) Fluxo: 1 mL/min	UV, 222 nm	5 - 30 µg/mL
(ZHOU et al., 2014)	Matéria-prima	ALG, impurezas, produtos de degradação	Coluna C18 (250 × 4,6 mm, 5µm)	Eluição gradiente: UV: Ácido perclórico 1% (pH 3,0 ajustado com trietilamina): ACN Fluxo: 1 mL/min MS: A) Ácido fórmico 0,1% (pH 3,0): ACN (90:10) B) Ácido fórmico 0,1% (pH 3,0): ACN (40:60)	UV, 224 nm MS- ESI positivo e negativo	0,1 – 75 µg/mL LQ ≤ 2,4 ng/mL
(KAI et al., 2015)	Água de rios Método de extração: EFS	Vildagliptina, ALG, sitagliptina, linagliptina, pioglitazona, mitiglinida, glibenclamida, glimepirida	Coluna C18 (50 × 2,0 mm, 2 µm)	Eluição gradiente. A) Tampão formato de amônio 10 mM/ ACN/ Ácido fórmico (900:100:1) B) ACN/ Ácido fórmico (1000:1)	LC-MS/MS Ionização positiva	10 - 1000 ng/mL LD <0,1 ng/mL
(ASHUTOSH et al., 2015)	Plasma Método de extração: Ppt de proteínas com ACN	ALG, MET	Coluna C18 (150 x 4,6 mm, 3,5 µm)	Diidrogeniofosfato de sódio (pH 4,0): ACN (70:30 v/v). Fluxo: 1 mL/min	UV, 235 nm	ALG: 7,5 – 17,5 µg/mL MET: 300 - 700 µg/mL
(ZHANG et al., 2015)	Matéria-prima, Comprimidos	ALG, impurezas	Coluna Ciano (250 × 4,6 mm, 5 µm)	Eluição gradiente A) água: ACN: ácido trifluoroacético (190:10:0,1 v/v/v) B) ACN: água: ácido trifluoroacético (190:10:0,1, v/v/v) Fluxo: 1 mL/min	UV, 278 nm	50 - 1000 ng/ml LQ ≤ 38,3 ng/mL

Referência	Matriz	Amostra	Fase estacionária	Fase móvel	Deteção	Intervalo de linearidade
(RUNJA; RAVIKUMAR; AVANAPU, 2016)	Comprimidos	ALG, MET	Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Tampão fosfato pH 4,8 ajustado com ácido ortofosfórico: ACN (48:52, v/v) Fluxo: 1,0 mL/min	PDA, 210 nm	3 - 18 µg/ml
(SUPRIYA et al., 2016)	Matéria-prima	ALG	Coluna C18 (150 x 4,6 mm, 3 µm)	Metanol: acetato de amônio 10 mM (pH 5,0 ajustado com ácido acético glacial) (80:20, v/v) Fluxo: 0,8 mL/min	UV, 276 nm	20 - 100 µg/ml
(LU et al., 2016)	Matéria-prima, Comprimidos	ALG e substâncias relacionadas (RS) (impurezas, produtos de degradação)	Coluna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm)	Eluição gradiente: A) Ácido fórmico 0,2%: acetato de amônio B) ACN: metanol (60:40, v/v) Fluxo: 1 mL/min	PDA, 278 nm LC-QTOF (MS) Ionização positiva	LD RS 3 - 2,17 ng/mL LD RS 7 - 1,15 ng/mL

Legenda: ALG: alogliptina; MET: metformina; UV: detector de ultravioleta; ACN: acetonitrila; ppt: precipitação de proteínas; ELL: Extração líquido-líquido; EFS: Extração em fase sólida; MI: metabólito I N-desmetilado da ALG; M II: metabólito N-acetilado da ALG; S-ALG: Isômero S da ALG; PDA: Detector de arranjo de fotodiodos; LQ: Limite de quantificação; LD: Limite de detecção.

3.6 Impurezas e substâncias relacionadas para a ALG

De acordo com a rota de síntese da ALG (figura 3.4) proposta por Zhang e colaboradores (2015), são descritas sete impurezas relacionadas (figura 3.5).

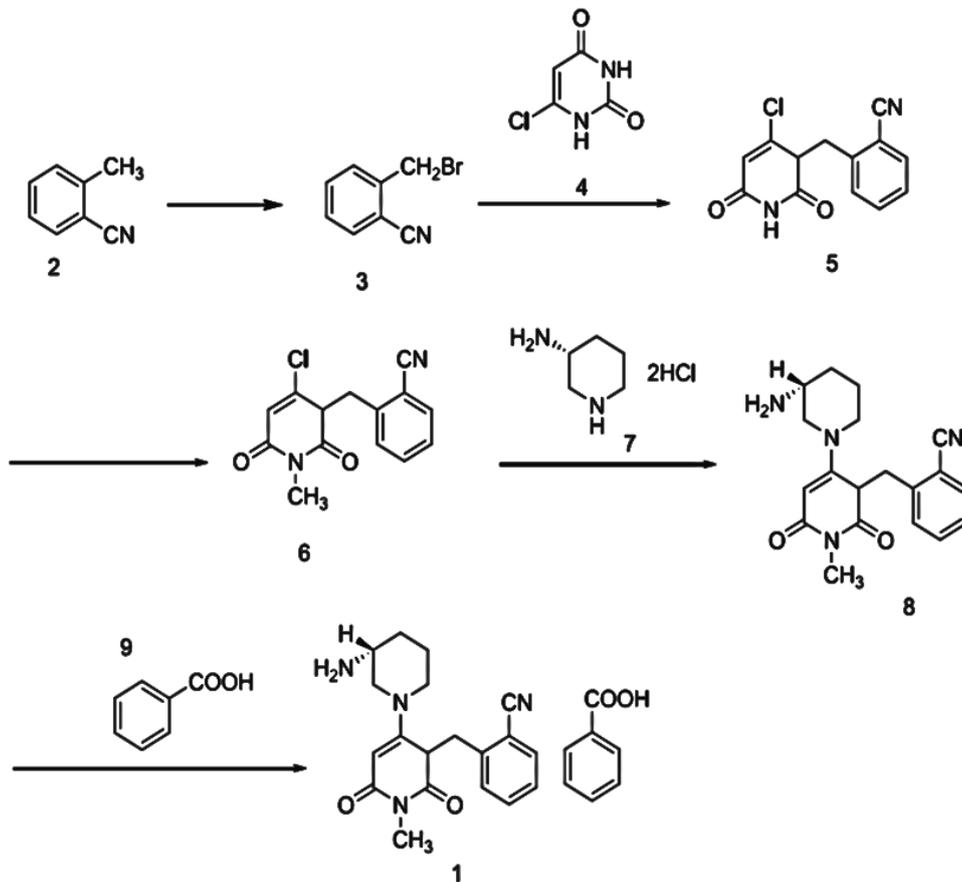


Figura 3.4 Rota de síntese do benzoato de ALG (ZHANG et al., 2015).

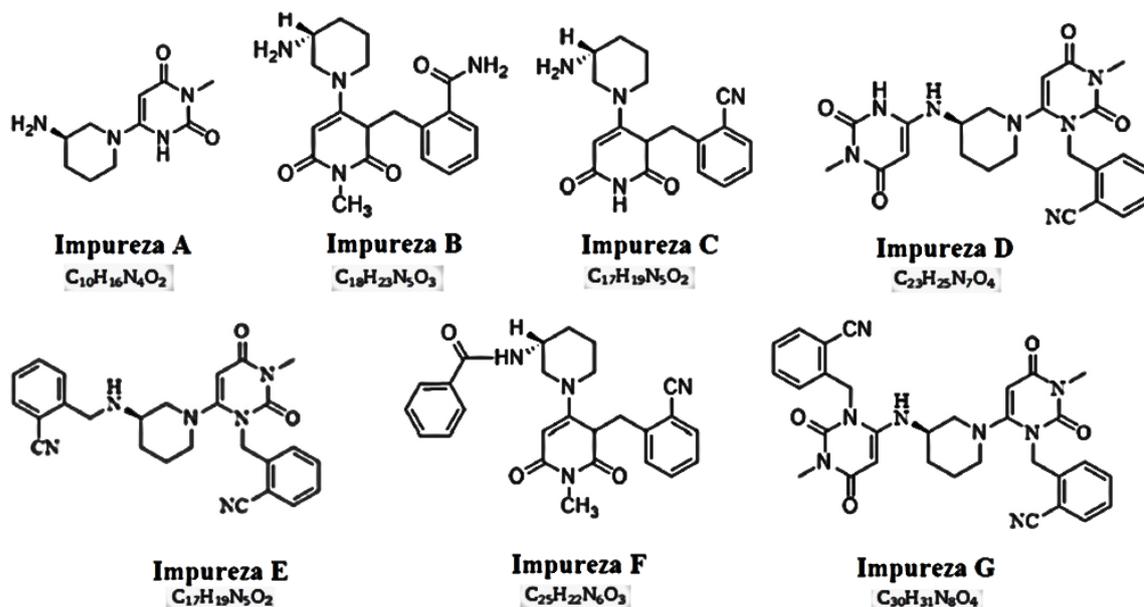


Figura 3.5 Estruturas de impurezas da ALG (Impureza C existe como o sal benzoato) (ZHANG et al., 2015).

A rota de síntese descrita na figura 3.4 pode gerar as impurezas da figura 3.5. O composto 1 mais o intermediário 3 resulta na impureza E. A impureza F é obtida a partir do composto 1 menos o benzoato, que se liga à estrutura. A impureza G se origina a partir do composto 1 mais o intermediário 6. A hidrólise do composto 1 resulta na impureza B. A impureza C procede da desmetilação do composto 1. A impureza D deriva da adição do composto 1 ao composto 4, seguido de uma reação de metilação. E a impureza A é gerada a partir da reação entre os compostos 7 e 4 (ZHANG et al., 2015).

Em análise de três lotes de comprimidos de ALG, as impurezas estavam presentes em menos de 0,1%. A impureza F não foi encontrada nas amostras (ZHANG et al., 2015).

Em estudo de desenvolvimento de preparação sólida contendo ALG e metformina, foram encontrados menos de 0,5% de substâncias relacionadas (RS) após submeter a formulação por um mês à temperatura de 40 °C, e umidade relativa de 22, 33, 44 e 57% (sem embalagem) (YAMAMOTO; HIROYOSHI, 2014).

Conforme o *International Conference on Harmonisation* (ICH), para fármacos administrados em doses menores que 2 g/ dia, o limite para impurezas é de 0,1 % (ICH, 2006a, 2006b).

No trabalho de Zhang e colaboradores (2015) as impurezas foram adquiridas da empresa Chiral-Tech Pharmaceutical Co.,Ltda (Beijing, China), e posteriormente foram caracterizadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (espectro de hidrogênio) e LC acoplada a detector de massas (MS).

Zhou e colaboradores (2014) também descreveram uma rota de síntese para a ALG (figura 3.6) com suas principais impurezas (Impurezas A, B, C, E, F, G, I, J, K, M, SMA, SMB, figura 3.7). A rota foi especulada, e posteriormente confirmada, onde os maiores produtos de degradação baseados em estudos de estresse foram analisados por HPLC-UV-ESI-MS, RMN e Espectrometria de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). As impurezas também foram adquiridas comercialmente (Nanjing Health Nice Medical Technology (Nanjing, China)). A formação das impurezas ocorre da seguinte forma: na rota 1, N-etil SMA (SMA = material de iniciação A: 6-cloro-3-metiluracila) e SMB (SMB = material de iniciação B: brometo de 2 -cianobenzila) formam a impureza B. Na rota 2, desmetil SMA e SMB reagem para formar a impureza A, então a impureza A reage com SMB originando a impureza C. Na rota 3, SMB e SMC (SMC = material de iniciação C: (R)-3-(boc-amino) piperidina) resultam na impureza K. Na rota 4, o intermediário 3 se decompõe na impureza F em ambiente ácido. O grupo ciano do intermediário 3 pode ser hidrolisado em condições alcalinas obtendo a impureza G. Na rota 5, o intermediário 3 e SMD (SMD = material de iniciação D: ácido benzoico) formam a impureza M. Cinco impurezas relacionadas ao processo de síntese foram detectadas na ALG em concentrações que variaram de 0,05 - 2 %, e dois produtos de degradação (nomeados impureza G e impureza F) foram encontrados no estudo de degradação forçada. As impurezas G e F foram separadas por cromatografia para posterior elucidação estrutural.

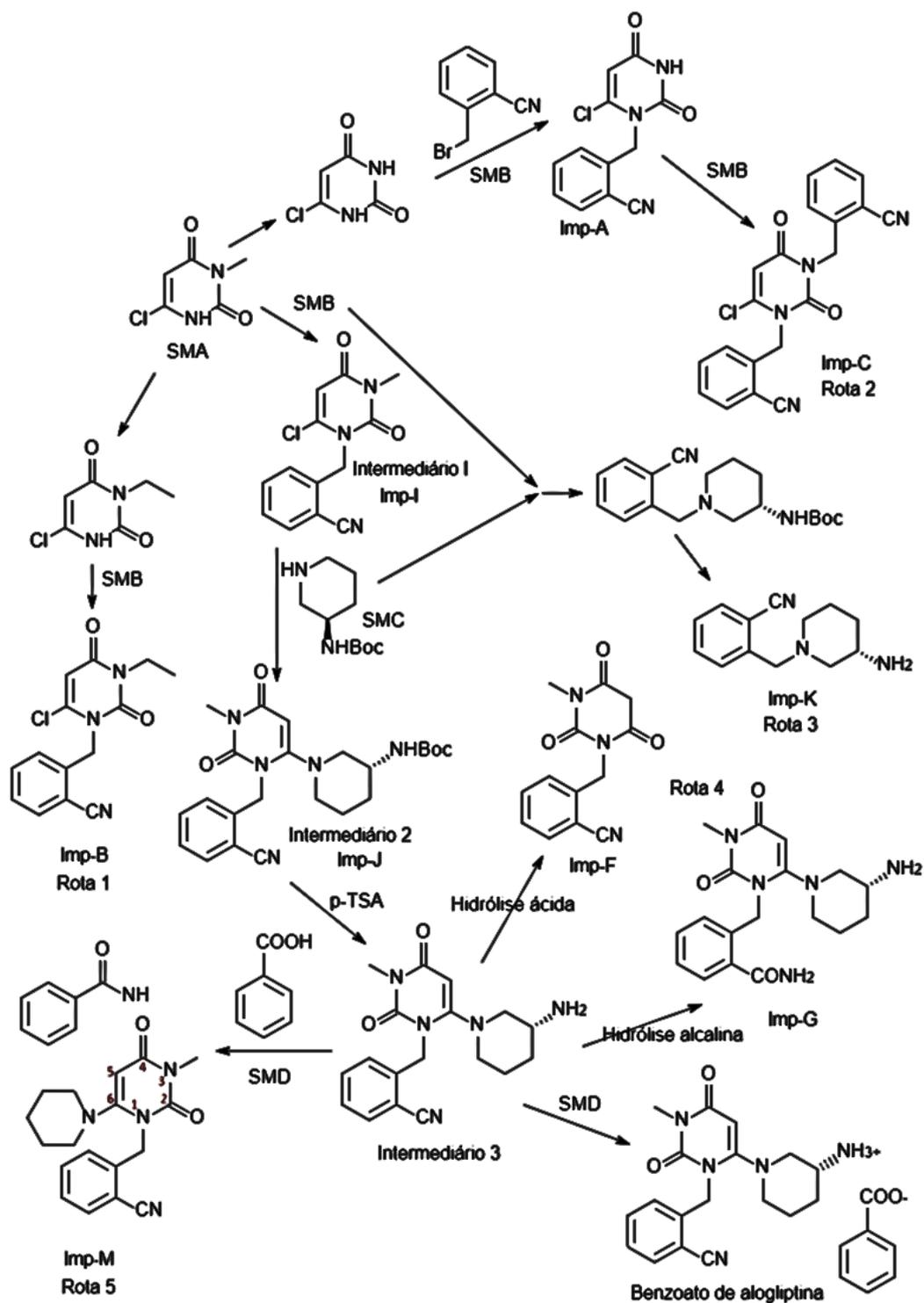


Figura 3.6 Rota de síntese do benzoato de ALG e suas potenciais impurezas (ZHOU et al., 2014). (SMA = material de iniciação A: 6 - cloro - 3 - metiluracil; SMB = material de iniciação B: brometo de 2 - cianobenzil; SMC = material de iniciação C: (R) 3 - (boc-amino) piperidina; SMD = material de iniciação D: ácido benzoico).

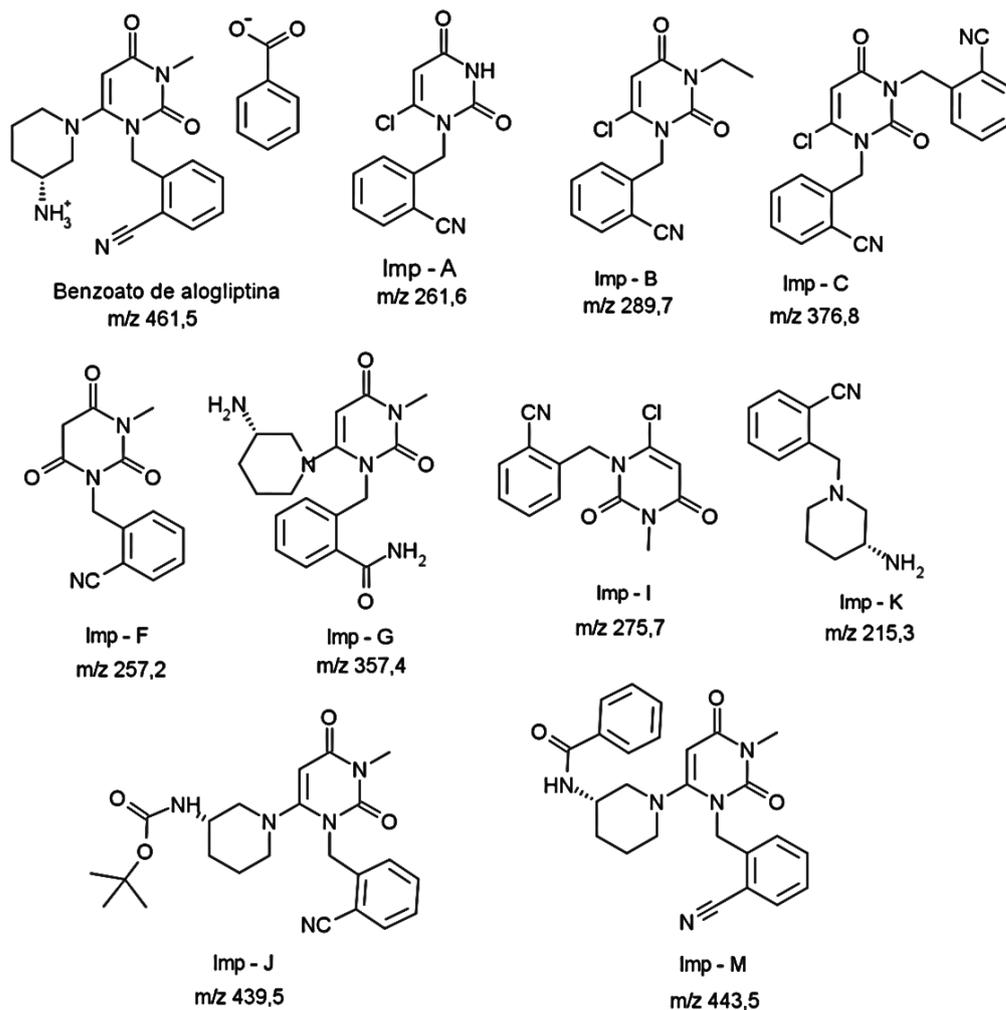


Figura 3.7 Impurezas químicas da ALG (ZHOU et al., 2014).

Lu e colaboradores (2016) descrevem uma rota de síntese (figura 3.8) muito semelhante às rotas demonstradas acima de Zhang e colaboradores (2014) e de Zhou e colaboradores (2014). Além da rota de síntese, os autores descrevem um método para separar e caracterizar as substâncias relacionadas (RS) e o principal produto de degradação na ALG e comprimidos, utilizando LC acoplado a espectroscopia de massas (QTOF – alta resolução). Foram caracterizadas sete RS (duas dessas foram sintetizadas e caracterizadas por RMN) e foram descritos seus principais íons de fragmentação.

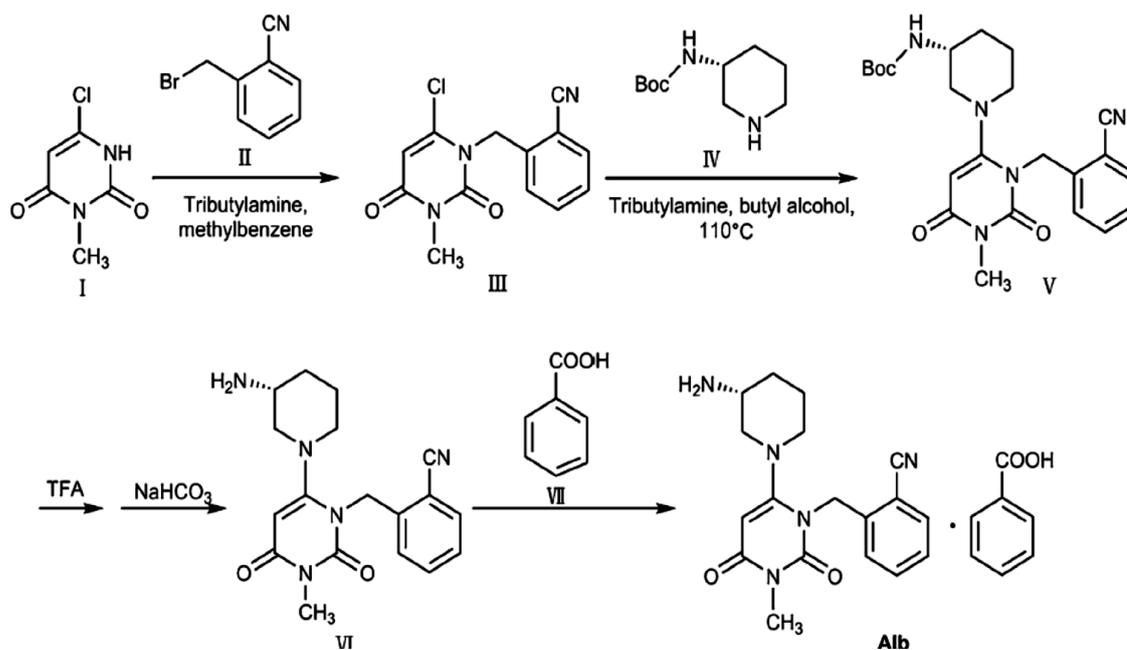


Figura 3.8 Rota de síntese do benzoato de alogliptina proposto por Lu et al., 2016.

Na tabela 3.1, estão descritos alguns métodos já publicados para a ALG, entretanto, nem todos estes métodos são indicativos de estabilidade, pois em muitos não foram realizados os estudos de degradação forçada. Na tabela 3.2, foi realizada uma compilação das condições de degradação forçada utilizadas para a ALG descritas na literatura nos trabalhos em que foram apresentados esses estudos.

Tabela 3.2 Condições de degradação forçada utilizadas para a ALG descritas na seção “especificidade” nos artigos.

Referência	Hidrólise ácida	Hidrólise alcalina	Oxidação	Degradação térmica	Fotólise
(REDDY; RAO; SARASWA THI, 2014)	HCl 0,1 mol/L e refluxo por 30 min a 80 °C	NaOH 0,1 mol/L e refluxo por 30 min a 80 °C	H ₂ O ₂ 3% e refluxo por 30 min a 80 °C	Aquecimento a 80 °C por 30 min;	Luz UV (254 nm) por 4 h Luz solar
(RUNJA; RAVIKUM AR; AVANAPU , 2016)	HCl 2 mol/L e aquecimento por 30 min a 60 °C	NaOH 2 mol/L e aquecimento por 30 min a 60 °C	H ₂ O ₂ 20% e aquecimento por 30 min a 60 °C	Estufa por 6h a 105 °C	Luz UV por 7 dias
(SRI et al., 2013)	HCl 0,1 mol/L por 90 min	NaOH 0,1 mol/L por 90 min	H ₂ O ₂ 3% por 15 min	Refluxo por 60 min	Não realizado
(ZHOU et al., 2014)	HCl 1 mol/L por 30 min a 80 °C	NaOH 1 mol/L por 2 h a 80 °C	H ₂ O ₂ 0,3% por 2h e aquecimento a 80°C por 1h	Aquecimento por 2 h a 80 °C	Luz UV (4500 lx por 2 dias)
(ZHANG et al., 2015)	HCl 0,1 mol/L por 30 min a 75 °C	NaOH 0,1 mol/L por 30 min a 75 °C	H ₂ O ₂ 15% por 30 min a 75 °C	Aquecimento em forno elétrico	Fármaco no estado sólido exposto à luz 4000 lx por 15 dias
(LU et al., 2016)	HCl 1,0 mol/L por 2h 60°C	NaOH 0,1 mol/L por 1h a 60 °C	H ₂ O ₂ 1%, por 2h a 60 °C	Em água, por 4h a 80 °C	Luz UV, por 72h (fármaco na forma sólida)

De acordo com Reddy, Rao, Saraswathi (2014), a molécula mostrou-se estável nas condições testadas. Em ácido, base, e temperatura os autores relatam o aparecimento de 2 picos; em luz solar e solução aquosa, 1 pico; após exposição à luz UV apareceram 3 picos; e em peróxido surgiram mais de 3 compostos. Entretanto, os

autores não apresentam cromatograma e nem descrevem o percentual de degradação da ALG (REDDY; RAO; SARASWATHI, 2014).

Runja, Ravikumar e Avanapu (2016) descrevem reduzida degradação tanto da ALG quanto da metformina em ácido (cerca de 7%), em base (cerca de 6%), em peróxido (cerca de 5%), em estufa (cerca de 4 %) e em luz UV (cerca de 1%). Em todas as condições, foram observados discretos picos de degradação nos cromatogramas (RUNJA; RAVIKUMAR; AVANAPU, 2016) (conforme figura 3.9), entretanto em uma análise crítica do cromatograma não se consegue visualizar os picos de degradação.

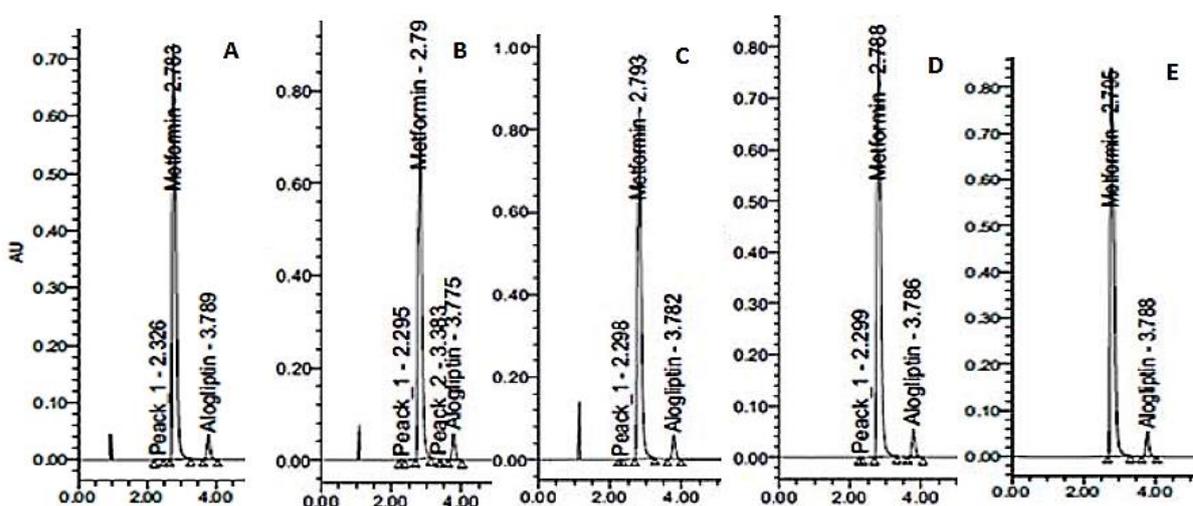


Figura 3.9 Cromatograma do estudo de degradação da ALG e metformina apresentado por (RUNJA; RAVIKUMAR; AVANAPU, 2016) nas condições A) ácida, B) básica, C) peróxido, D) térmica, E) fotolítica.

Sri e colaboradores (2013) descrevem degradação da ALG em ácido (3,4%), base (1,4%), peróxido (12,8%), e térmica (5,5%). O método foi desenvolvido para os fármacos ALG e metformina, e os autores observaram alguns reduzidos picos de degradação nas condições testadas (SRI et al., 2013), porém não está descrito quais são os picos de degradação da ALG e quais são da metformina (conforme figura 3.10). No cromatograma da condição oxidativa observa-se apenas o pico referente ao peróxido.

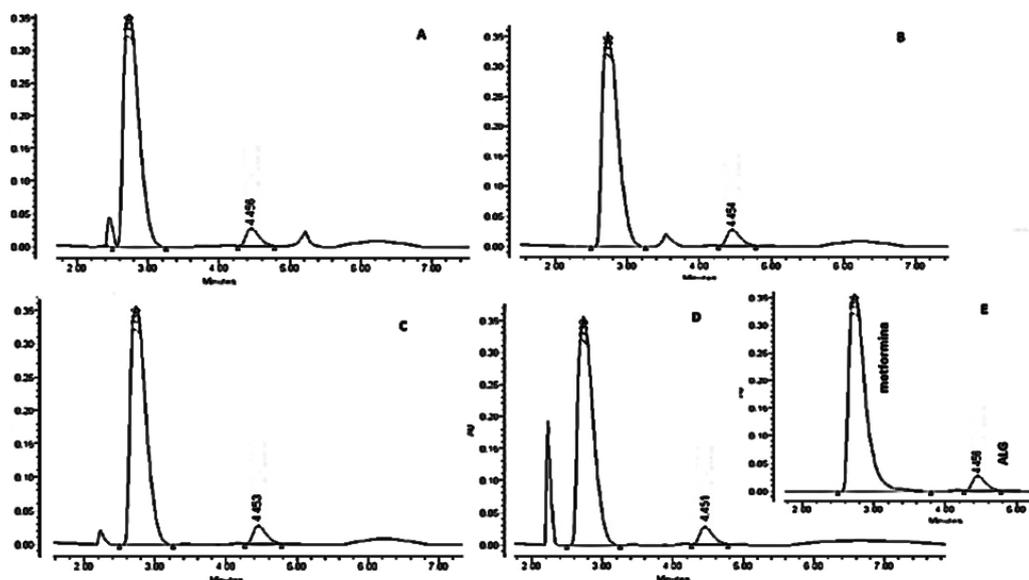


Figura 3.10 Cromatograma do estudo de degradação da ALG e metformina (SRI et al., 2013) nas condições A) térmica, B) ácida, C) básica, D) oxidativa, E) padrões dos fármacos.

De acordo com Zhou e colaboradores (2014), o fármaco foi instável em condições ácidas (teor de 42,40%, 16,43% de impurezas, principal impureza F) e básicas (teor de 60,03%, 7,81% de impurezas, principal impureza G) (figura 3.7), e não foram observados picos referentes a produtos de degradação na condição térmica (teor de 64,23%) e de luz UV (teor de 65,37%), e, em peróxido houve discreta degradação (teor de 64,83%) (conforme figura 3.11).

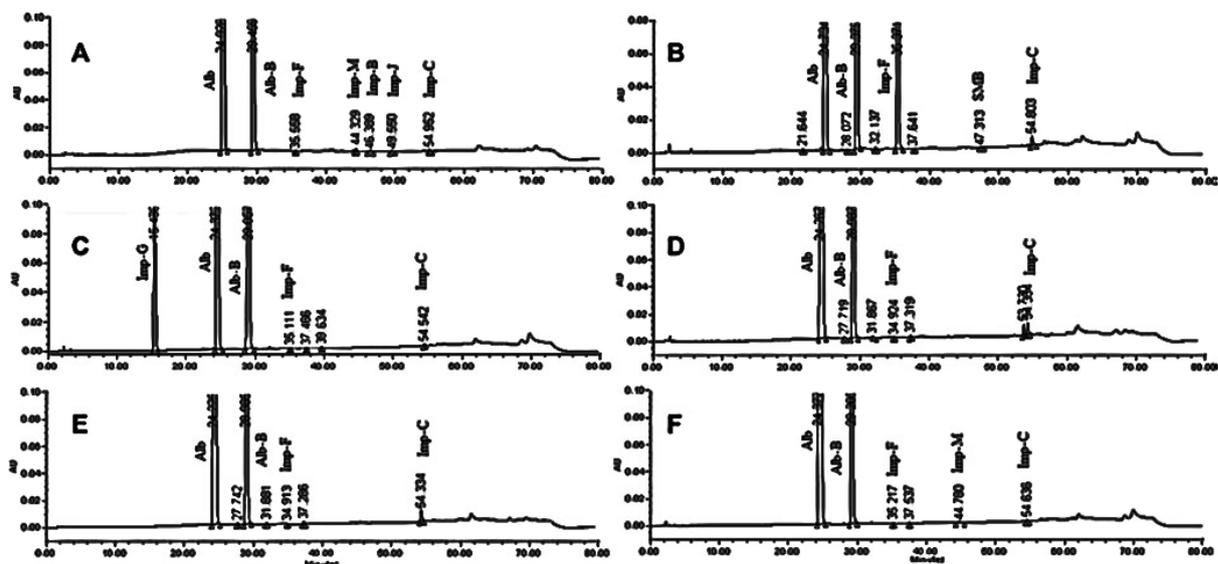


Figura 3.11 Cromatograma do estudo de degradação da ALG apresentado por (ZHOU et al., 2014) nas condições A) sem degradação, B) ácida, C) básica, D) oxidativa, E) fotolítica (luz UV por 2 dias), F) térmica.

As impurezas surgiram principalmente a partir de duas vias: durante o processo produtivo e a partir da degradação do produto principal durante o armazenamento. Durante as reações, os materiais de iniciação ou intermediários permanecem podendo tornar-se impurezas presentes no fármaco. Zhang e colaboradores (2015), não descrevem o percentual de degradação do fármaco, mas os cromatogramas dos autores (conforme figura 3.12) demonstram produtos de degradação em todas as condições estudadas.

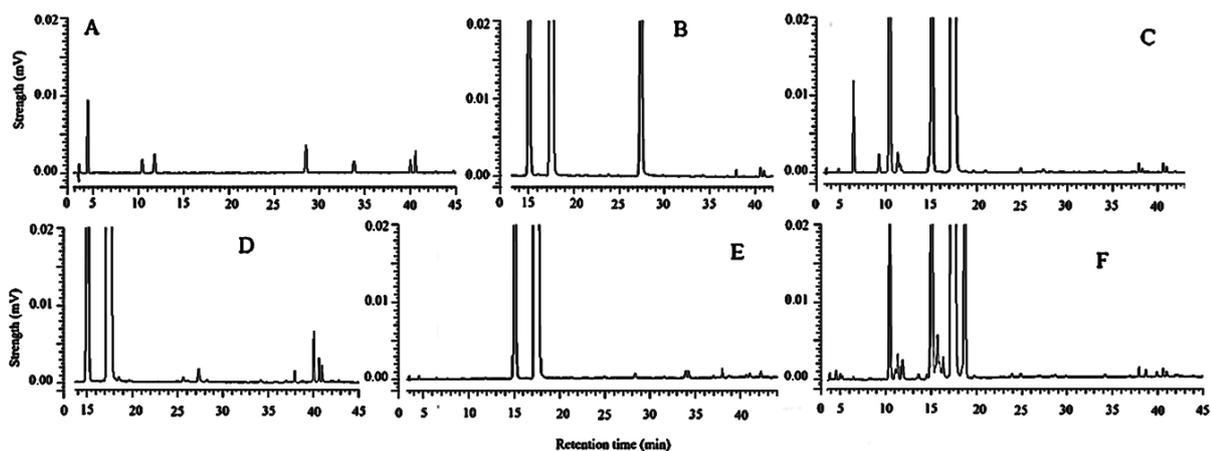


Figura 3.12 Cromatograma do estudo de degradação forçada da ALG (ZHANG et al., 2015) onde são apresentados em A) impurezas A, B, C, D, E, F e G; B) degradação ácida; C) degradação básica; D) aquecimento; E) luz F) degradação oxidativa. Os picos em 15 minutos e em 18 minutos são do benzoato e da ALG, respectivamente.

Lu e colaboradores (2016) observaram que a ALG sofre degradação em condições ácida, alcalina, oxidativa e térmica na presença de umidade, apresentando relativa estabilidade ao estresse fotolítico. Sete RS na ALG foram detectadas e caracterizadas, sendo três RS na matéria-prima (RS 2, 3 e 6) e duas nos comprimidos (RS 4 e 7) (conforme figura 3.13). Somente a RS 6 e a RS 7 tiveram um percentual maior que 0,1%. A RS 1 e RS 5 são formadas somente nas condições de estresse, enquanto as outras também são formadas durante a rota de síntese. Degradação da ALG ocorreu em condições ácida (RS 5), alcalina (RS 1 e 2), térmica (RS 3) e oxidativa (RS 2 e 4), e não foi observada degradação sob condições fotolíticas. Os autores descrevem também os principais íons moleculares de todas as RS e suas características (tabela 3.3). A ALG ($C_{18}H_{22}N_5O_2^+$) tem íon molecular $m/z = 340,18$, e principais íons 323,15, 266,13, 116,05, 84,08. A RS 1 resultou da hidrólise do anel 3,4-diidro-3metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil. A RS 2 foi formada após a hidrólise na metade do 2-metil-benzonitrila. A RS 3 foi introduzida possivelmente na segunda etapa da rota sintética da ALG (Figura 3.8, composto V). A quantidade de RS 3 aumentou quando ALG foi aquecida na presença de umidade, ou seca em elevadas temperaturas. A RS 3 apresenta um anel piridínico parcialmente saturado em vez de

um anel pirimidínico, como na ALG. A RS 4 foi formada após oxidação na posição 5 do anel pirimidinil para formar uma ponte de hidrogênio intramolecular com o 4-oxo ou formar o isômero 2,4,5-trioxo -1(2H)-pirimidinil. Na RS 5 houve a substituição do 6-(3-amino-1-piperidinil) na ALG por 6-hidroxil. RS 6 é derivada da rota de síntese da ALG, com reduzida polaridade, devido ao uso do n-butanol na segunda etapa de síntese, que condensou com a benzonitrila da ALG. A RS 7 está relacionada ao processo de formulação dos comprimidos. Na análise do espectro de massas, foi detectada a adição do grupo carbonila e a presença de 3-piperidinil-formamida. RS 7 foi confirmada por síntese química utilizando formato de etila como agente de formulação. A RS 3, principal RS obtida na rota de síntese e produzida facilmente sob condições de estresse térmico (água a 80 °C/ 4h), pode ser eliminada diminuindo a temperatura de secagem durante o preparo para ambos o fármaco e os comprimidos.

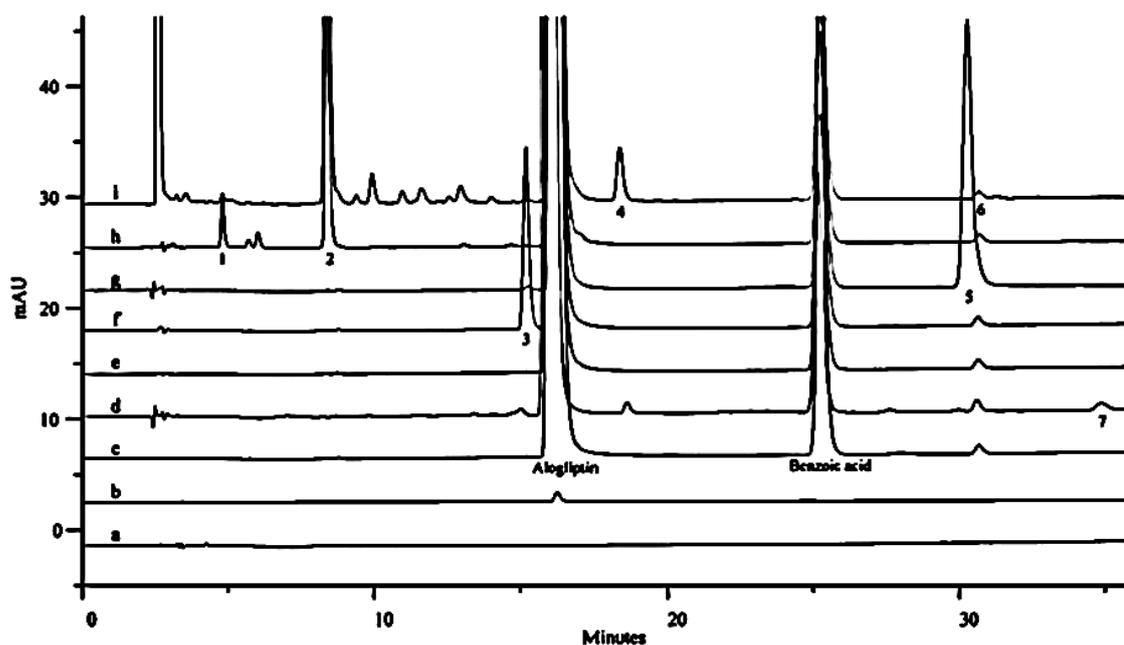
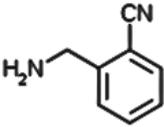
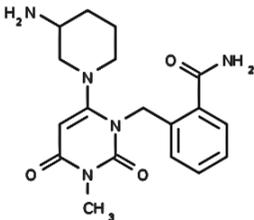
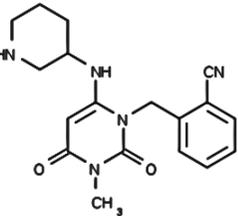
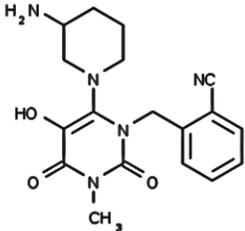


Figura 3.13 Cromatograma do estudo de degradação da ALG (LU et al., 2016) nas condições A) branco, B) solução de referência, C) ALG matéria-prima, D) ALG comprimidos, E) fotolítica, F) térmica, g) ácida, h) básica, i) oxidativa.

Tabela 3.3 Sustâncias relacionadas (RS) (produtos de degradação e impurezas derivadas do processo de síntese) relacionadas ao fármaco e aos comprimidos de ALG propostas por (LU et al., 2016).

RS	Íon molecular	m/z	Nome químico	Características	Condições de formação	Estrutura química
1	$C_8H_9N_2^+$	133,08	2-aminometil-benzonitrila	alta polaridade	Hidrólise básica	
2	$C_{18}H_{24}N_5O_3^+$	358,19	2-[[6-(3-amino-1-piperidinil)-3,4-diidro-3-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil]metil]-benzamida	polaridade menor que RS 1, porém maior que da ALG	RS ALG Hidrólise básica Oxidação	
3	$C_{18}H_{22}N_5O_2^+$	340,1	2-[[6-(3-piperidinilamino)-3,4-diidro-3-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil]metil]-benzonitrila	polaridade semelhante a ALG	RS ALG Hidrólise térmica	
4	$C_{18}H_{22}N_5O_3^+$	356,17	2-[[6-(3-amino-1-piperidinil)-3,4-diidro-5-hidroxi-3-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil]metil]-benzonitrila	menos polar que a ALG	RS ALG comprimidos Oxidação	

RS	Íon molecular	m/z	Nome químico	Características	Condições de formação	Estrutura química
5	$C_{13}H_{12}N_3O_3^+$	258,09	2-[[3,4,5,6-tetraidro-3-metil-2,4,6-trioxo-1(2H)-pirimidinil]metil]-benzonitrila	menos polar que a ALG	Hidrólise ácida	
6	$C_{22}H_{32}N_5O_3^+$	414,25	N-butil-2-[[6-(3-amino-1-piperidinil)-3,4-diidro-3-metil-2,4-dioxo-1(2H)-pirimidinil]metil]benzamida	reduzida polaridade	RS ALG	
7	$C_{19}H_{22}N_5O_3^+$	368,17 15	1-[[1- [(2- cianofenil) metil] - 3-metil- 2, 4-dioxo- 1(2H)-pirimidinil] -3- piperidinil]-formamida		RS ALG comprimidos	

As impurezas e as rotas de síntese descritas por Zhou e colaboradores (2014), Zhang e colaboradores (2015) e Lu e colaboradores (2016) são diferentes, porém apresentam algumas semelhanças.

Comparando as impurezas descritas pelos diferentes autores, em condições ácidas, Zhou e colaboradores (2014) descrevem como principal impureza, a F (figura 3.7), que é a mesma que a RS 5 descrita por Lu e colaboradores (2016) (tabela 3.3).

Em condições básicas a impureza G (figura 3.7) de Zhou e colaboradores (2014) é a mesma que a RS 2 de Lu e colaboradores (2016), e a mesma que a impureza B descrita por Zhang e colaboradores (2015), porém estes últimos autores desenharam a estrutura com um nitrogênio a menos entre os carbonos 2 e 6 no anel pirimidina (destacado na Imp-M na figura 3.6), provavelmente por um descuido, pois ao descreverem o número de nitrogênios na fórmula química, este número não concorda com o número de nitrogênios desenhados na estrutura. Zhou e colaboradores (2014) descrevem que há a formação dessa impureza após hidrólise básica, Zhang e colaboradores (2015) descreve que há a formação dessa impureza após hidrólise, sem especificar se ocorre em ambiente ácido ou básico, e Lu e colaboradores (2016) descrevem que essa impureza se forma após hidrólise básica e oxidação. Outra diferença na impureza citada é que os autores desenharam o NH_2 ligado à piperidina como 3S, enquanto os outros autores como 3R.

Além disso, a impureza M de Zhou e colaboradores (2014) é semelhante à impureza F de Zhang e colaboradores (2015), e novamente a impureza F é desenhada com um nitrogênio a menos no anel pirimidina. Ambos os autores descrevem que essa impureza é a ligação do benzoato à própria estrutura do fármaco. As outras impurezas descritas são diferentes entre os autores.

Em relação às metodologias para determinação da ALG encontradas na literatura percebe-se que muitas apresentam uma validação incompleta, pois não contemplam estudos de especificidade. Os estudos que contemplam a especificidade apresentam condições de estresse e resultados distintos, bem como cromatogramas com uma qualidade inadequada, pois contém picos referentes a produtos de degradação praticamente imperceptíveis. Diante do exposto, justificam-se novos estudos relacionados ao desenvolvimento de métodos analíticos para o fármaco ALG.

REFERÊNCIAS

AHRÉN, B. GLP-1 for type 2 diabetes. **Experimental Cell Research**, v. 317, p. 1239 – 1245, 2011.

ASHUTOSH, K. S.; MANIDIPA, D.; SESHAGIRI, R. J. V. L. N.; GOWRI, S. D. Chromatography new validated stability indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of metformin and alogliptin in human plasma. **Chromatography Separation Techniques**, v. 6, n. 6, p. 6–11, 2015.

BARNETT, A. H. Linagliptin: a novel dipeptidyl peptidase 4 inhibitor with a unique place in therapy. **Advances in Therapy**, v. 28, n.6, p. 447-459, 2011.

BRASIL, 2016. Consulta de produtos ANVISA. Disponível em: http://www7.anvisa.gov.br/datavisa/consulta_produto/Medicamentos/frmConsultaMedicamentosPersistir.asp. Acesso em: 11/10/2016.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B.; KNOLLMANN, B. C.; FONSECA, A. L. **Goodman & Gilman as bases farmacológicas da terapêutica - 12. ed.** Porto Alegre: AMGH, 2012.

CHAVDA, H. V.; PATEL, C. N.; ANAND, I. S. Biopharmaceutics classification system. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 62-69, 2010.

CHRISTOPHER, R. .; COVINGTON, P.; DAVENPORT, M.; FLECK, P.; MEKKI, Q. A.; WANN, E. R.; KARIM, A. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of single increasing doses of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor alogliptin in healthy male subjects. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 3, p. 513–527, 2008.

COVINGTON, P.; CHRISTOPHER, R.; DAVENPORT, M.; FLECK, P.; MEKKI, Q. A.; WANN, E. R.; KARIM, A. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and tolerability profiles of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor alogliptin: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multiple-dose study in adult patients with type 2 diabetes. **Clinical Therapeutics**, v. 30, n. 3, p. 499-512, 2008.

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. 215–218, 2012.

FDA, 2013a. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm?fuseaction=Search.Label_ApprovalHistory#aphist. Acessado em: 28 de maio de 2013.

FDA, 2013b. Disponível em:

http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/022271Orig1s000ChemRedt.pdf. Acessado em: 25 de janeiro de 2014.

FDA, 2013c. Disponível em:

http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/022271s000lbl.pdf. Acessado em: 20 de junho de 2013.

FDA, 2013d. Disponível em:

http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/022271Orig1s000ClinPharmR.pdf. Acessado em: 28 de junho de 2014.

FDA, 2016. Disponível em:

<http://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm128219.htm>. Acessado em: 10 de março de 2016.

FENG, J.; ZHANG, Z.; WALLACE, M. B.; STAFFORD, J. A.; KALDOR, S. W.; KASSEL, D. B.; NAVRE, M.; SHI, L.; SKENE, R. J.; ASAKAWA, T.; TAKEUCHI, K.; XU, R.; WEBB, D. R.; GWALTNEY, S. L. Discovery of alogliptin: a potent, selective, bioavailable, and efficacious inhibitor of dipeptidyl peptidase IV. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 2297-2300, 2007.

GALLWITZ, B.; ROSENSTOCK, J.; RAUCH, T.; BHATTACHARYA, S.; PATEL, S.; EYNATTEN, M. VON.; DUGI, K. A.; WOERLE, H. J. 2-year efficacy and safety of linagliptin compared with glimepiride in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin: a randomised, double-blind, non-inferiority trial. **Lancet**, v. 380, p. 475–483, 2012.

GERICH, J. DPP-4 inhibitors: What may be the clinical differentiators? **Diabetes research and clinical practice**, v. 90, p. 131-140, 2010.

HANNA, A.; WOO, V.; YALE, J.-F.; COOKE, E. M. Incretin-based therapies (Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase - 4 inhibitors) for the treatment of type 2 diabetes. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 36, p. 9-14, 2012.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Q3a (R2):**

Impurities in New Drug Substances. 2006a. Disponível em:

<http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2015.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Q3B (R2):**

Impurities in New Drug Products. 2006b. Disponível em:

<http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2_Guideline.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2015.

IDF- International Diabetes Federation. Clinical Guidelines Task Force. Global guideline for type 2 diabetes. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2012. Disponível em: <http://www.idf.org/sites/default/files/IDF%20Guideline%20for%20Type%20%20Diabetes.pdf>. Acessado em 28 de janeiro de 2013.

KAI, S.; ISHIKAWA, K.; ITO, H.; OGAWA, T.; YAMASHITA, H.; NAGATA, Y.; KANAZAWA, H. Simultaneous analysis of oral antidiabetic drug by LC-MS/MS. **Chromatography**, v. 36, n. 1, p. 19–24, 2015.

KUMAR, A. P.; ARUNA, G.; RAJASEKAR, K.; REDDY, P. J. Analytical method development and validation of alogliptin and metformin hydrochloride tablet dosage form by RP-HPLC method. **International Bulletin of Drug Research**, v. 3, n. 5, p. 58–68, 2013.

LANKAS, G. R.; LEITING, B.; ROY, R. S.; EIERMANN, G. J.; BECONI, M. G.; BIFTU, T.; CHAN, C. C.; EDMONDSON, S.; FEENEY, W. P.; HE, H.; IPPOLITO, D. E.; KIM, D.; LYONS, K. A.; OK, H. O.; PATEL, R. A.; PETROV, A. N.; PRYOR, K. A.; QIAN, X.; REIGLE, L.; WOODS, A.; WU, J. K.; ZALLER, D.; ZHANG, X.; ZHU, L.; WEBER, A. E.; THORNBERRY, N. A. Dipeptidyl peptidase IV inhibition for the treatment of type 2 diabetes potential importance of selectivity over dipeptidyl peptidases 8 and 9. **Diabetes**, v. 54, p. 2988–2994, 2005.

LEE, B.; SHI, L.; KASSEL, D. B.; ASAKAWA, T.; TAKEUCHI, K.; CHRISTOPHER, R. J. Pharmacokinetic, pharmacodynamic, and efficacy profiles of alogliptin, a novel inhibitor of dipeptidyl peptidase-4, in rats, dogs, and monkeys. **European Journal of Pharmacology**, v. 589, p. 306–314, 2008.

LU, Y.; YANG, D.; LI, Z.; HANG, T.; SONG, M. Isolation and characterization of related substances in alogliptin benzoate by LC-QTOF mass spectrometric techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 128, p. 253–263, 2016.

MORITOH, Y.; TAKEUCHI, K.; ASAKAWA, T.; KATAOKA, O.; ODAKA, H. Chronic administration of alogliptin, a novel, potent, and highly selective dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, improves glycemic control and beta-cell function in obese diabetic ob/ob mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 588, p. 325–332, 2008.

NEUMILLER, J. J.; SETTER, S. M. Review of linagliptin for the treatment of type 2 Diabetes Mellitus. **Clinical Therapeutics**, v. 34, n. 5, p. 993–1005, 2012.

RAO, G. S.; MALLESH, K.; VIJAY KUMAR, G.; SUREKHA, C.; RAO, B. V. A validated chiral HPLC method for the enantiomeric purity of alogliptin benzoate. **Der Pharma Chemica**, v. 6, n. 3, p. 234–239, 2014.

REDDY, B. R. C. S.; RAO, N. V. B.; SARASWATHI, K. Development of rapid and robust stability-indicating method for analysis of alogliptin benzoate in pharmaceutical

formulations using reverse phase liquid chromatography. **International Journal of Advances in Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 6, p. 319–325, 2014.

RICHARD, K. R.; SHELBURNE, J. S.; KIRK, J. K. Tolerability of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: A review. **Clinical Therapeutics**, v. 33, n. 11, p. 1609-1629, 2011.

RUNJA, C.; RAVIKUMAR, P.; AVANAPU, S. R. Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous estimation of alogliptin benzoate and metformin hydrochloride in tablet dosage form. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 116–120, 2016.

RYDÉN, L.; STANDL, E.; BARTNIK, M.; VAN DEN BERGHE, G.; BETTERIDGE, J.; BÔER, M. J.; COSENTINO, F.; JÖNSSON, B.; LAAKSO, M.; MALMBERG, K.; PRIORI, S.; ÖSTERGREN, J.; TUOMILEHTO, J.; THRAINSDOTTIR, I. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases: full text. The task force on diabetes and cardiovascular diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for the Study of Diabetes (EASD). **European Heart Journal**. The European Society of Cardiology and European Association for the Study of Diabetes (EASD), p. 1-72, 2007.

SAICHO, Y. Alogliptin benzoate for the treatment of type 2 diabetes. **Vascular Health and Risk Management**, v. 11, p. 229–243, 2015.

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.

SMELTZER, S. C.; BARE, B. G. **Tratado de Enfermagem Médico-Cirúrgica**. 9ª edição, v. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2002.

SMERP, 2016. smERP - Consulta de Registros ANVISA. Disponível em: <https://www.smerp.com.br/anvisa/?ac=prodSearch&page=1&fastSearch=&anvisaType=0&anvisaId=&anvisaIdType=0&anvisaProcN=&anvisaProcNType=0&anvisaProdDesc=nesina&anvisaProdDescType=0&anvisaProdCat=&anvisaProdCatType=0&anvisaProdMod=&anvisaProdModType=0&anvisaHolderReg=&anvisaHolderRegType=0&anvisaProdOrig=&anvisaProdOrigType=0#results>. Acesso em 11/10/2016.

SRI, G. S.; KUMAR, S. A.; SARAVANAN, J.; DEBNATH, M.; GREESHMA, V.; KRISHNA, N. S. A new stability indicating RP-HPLC method development for simultaneous estimation of metformin and alogliptin in bulk as well as in pharmaceutical formulation by using PDA detector. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 11, p. 9222–9241, 2013.

SUPRIYA, P.; LATHA N, M.; ROHITH, K. B. V.; RAMANA, G. V.; HARINI, U.; PAWAR, A. K. M. Development and validation of UV spectrophotometric and reversed phase - high performance liquid chromatography - PDA methods for the

estimation of alogliptin benzoate. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 1, p. 282–287, 2016.

TAHRANI, A. A.; BAILEY, C. O. J.; DEL PRATO, S.; BARNETT, A. H. Management of type 2 diabetes: new and future developments in treatment. **Lancet**, v. 378, n. 9, p. 182–97, 2011.

WATSON, D. G. **Pharmaceutical Analysis. A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists**. 2th ed. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

WHITE, W. B.; CANNON, C. P.; HELLER, S. R.; NISSEN, S. E.; BERGENSTAL, R. M.; BAKRIS, G. L.; PEREZ, A. T.; FLECK, P. R.; MEHTA, C. R.; KUPFER, S.; WILSON, C.; CUSHMAN, W. C.; ZANNAD, F. Alogliptin after Acute Coronary Syndrome in Patients with Type 2 Diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 14, p. 1327-1335, 2013.

YADAV, P. J.; JADHAV, S. S.; MOHITE, S. K. Development and validation of RP-HPLC method for alogliptin benzoate in bulk drug and dosage form. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research**, v. 1, n. 2, p. 1–9, 2014.

YAMAMOTO, K.; HIROYOSHI, K. **Solid preparation comprising alogliptin and metformin hydrochloride. US 8900638 B2**, 2014. Disponível em: <<https://www.google.ch/patents/US8900638>>

ZANNAD, F.; CANNON, C. P.; CUSHMAN, W. C.; BAKRIS, G. L.; MENON, V.; PEREZ, A. T.; FLECK, P. R.; MEHTA, C. R.; KUPFER, S.; WILSON, C.; LAM, H.; WHITE, W. B. Heart failure and mortality outcomes in patients with type 2 diabetes taking alogliptin versus placebo in EXAMINE: A multicentre, randomised, double-blind trial. **The Lancet**, v. 385, p. 2067-2076, 2015.

ZHANG, K. MA, P.; JING, W.; ZHANG, X. A developed HPLC method for the determination of alogliptin benzoate and its potential impurities in bulk drug and tablets. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 2, p. 152–158, 2015.

ZHOU, Y. ZHOU, W.; SUN, L.; ZOU, Q.; WEI, P.; OUYANG, P. Characterization of process-related impurities including forced degradation products of alogliptin benzoate and the development of the corresponding reversed-phase high-performance liquid chromatography method. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 11, p. 1248–1255, 2014.

**4. CAPÍTULO I – Análise qualitativa: Caracterização físico-química da
alogliptina**

Artigo submetido ao *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* (comprovante de
submissão anexo 1).

**Physicochemical characterization of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor
alogliptin**

C. D. Bertol^{1,2*}, R. N. Pereira³, C. Mendes³; A. S. Paulino³, M. A. S. Silva³, P. E.
Froehlich²

¹ Curso de Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, RS, Brasil

² Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Produção de Substâncias Químicas de Referência, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil

³ Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Controle de Qualidade, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil

* Correspondence: Charise D. Bertol, Curso de Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo, Campus I, Km 292, BR 285, Bairro São José, CEP 99052-900, Passo Fundo/ RS, Brasil. Fone: 55 54 3316-8499. Email: charibertol@yahoo.com.br, charise@upf.br

Abstract

Alogliptin (ALG) is a hypoglycemic drug used in diabetes which inhibits the enzyme dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4), preventing the degradation of incretins, stimulating insulin secretion. The physicochemical characteristics of ALG were evaluated by differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry analysis (TGA) and scanning electron microscopy equipped with energy dispersive X-ray spectrometer (SEM/EDS). The compatibility studies were carried using ALG and excipients (physical mixtures, 1:1) using DSC, TGA, diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray powder diffraction (XRPD) and hot-stage microscopy. ALG presented purity near to 99%, melted in the range of 179.4 – 187.2

°C, followed by decomposition which started at 198.0 °C. SEM/EMS analysis of ALG presented irregular crystals and traces of impurities as copper and lead. DSC investigations obtained by physical mixtures showed minor alterations in the melting ranges of ALG with mannitol, magnesium stearate and commercial tablets. Solubilization of ALG in the fused excipient was observed by hot stage microscopy between mannitol and ALG, and in tablets. The interaction in the mixture with magnesium stearate is due to the melting of the excipient and drug separately, first the excipient then the drug. FTIR showed additional bands related to the excipients. XRPD proved that ALG has a crystal form and no alterations in the ALG profile was observed after the mixtures. ALG was compatible with all excipients tested. These results were important to understand the characteristics, stability and compatibility of the drug, and proved to be useful in pre-formulation studies.

Keywords: alogliptin, compatibility studies, crystallinity, thermo analysis

4.1 Introduction

The International Diabetes Federation estimates that every 6 seconds one person dies from diabetes, totaling 5.0 million of deaths by year. More than two thirds of people with type 2 diabetes mellitus (T2DM) are undiagnosed in Africa (IDF, 2016). Some treatments and class of drugs are available for T2DM; among them there is a relatively new class of drugs: the dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors. The first drug of this class was sitagliptin, approved by FDA in 2006. DPP-4 is an enzyme that inactivates both incretins glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic hormone, abbreviated by GLP-1 and GIP, respectively. Incretins are secreted by intestine enteroendocrine cells within minutes of food ingestion and stimulated insulin secretion in a glucose-dependent manner (DRUCKER; NAUCK, 2006; GERICH, 2010; HANNA et al., 2012). DPP-4 inhibitors prevent incretins degradation, enhancing the effect of these hormones.

Alogliptin (ALG) is an oral hypoglycemic drug, with a quinazolinone structure, which inhibits non-covalently the DPP-4 with high selectivity and affinity (figure 4.1).

ALG exhibits selectivity greater than 10,000-fold for DPP-4 enzyme against DPP-8 and DPP-9 (FENG et al., 2007). This DPP-4 selectivity is important because the inhibition of DPP-8 and DPP-9 takes to multi-organs toxicity in rats and dogs and attenuation of the activation of T-humans cells *in vitro* (LANKAS et al., 2005). ALG was discovered in 2007 (FENG et al., 2007), approved by Japan in 2010 and by FDA in 2013 and in September, 2014 it was available in 39 countries (SAICHO, 2015). This drug is not described in any Pharmacopeia.

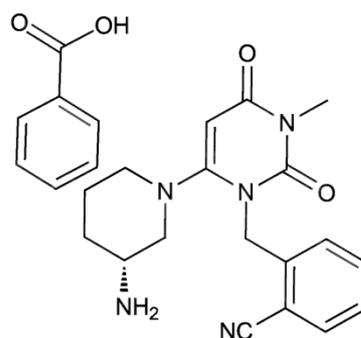


Figure 4.1 Chemical structure of alogliptin benzoate.

Thermal analysis, infrared spectroscopy, X-ray diffraction and microscopy techniques are important tools to characterize drugs and assist in the pre-formulation stage to obtain stable and appropriate dosage forms for the intended use. These techniques provide information about the physical properties, kinetic analysis, polymorphic forms and stability of materials, as well as to assess its compatibility with excipients (BRUNI et al., 2002; GIRON, 1998a, 1998b; GUPTA; KAR, 2015; MATOS et al., 2016; MURA; GRATTEI; FAUCCI, 2002; TELEGINSKI et al., 2015). Considering the drug ALG, many of the studies available focused mainly in the *in vivo* effects. In this way, we aimed to characterize the physicochemical properties and to perform compatibility studies of ALG. The compatibility studies were made with the drug and excipients used in the tablets commercially available.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Materials

ALG active pharmaceutical ingredient (API) was purchased from China (Lanospharma Laboratories Co., Ltd). Tablets (Nesina®) with 25 mg of ALG were purchased from the USA market. The excipients used were hydroxypropylcellulose (HPC) (Pharmanostra, Brazil), mannitol (Henrifarma Produtos Químicos e Farmacêuticos, Brazil), microcrystalline cellulose (Microcel MC-102, Blanver, Brazil), magnesium stearate (Valdequímica, Brazil) and croscarmellose sodium (Solutab Blanver, Brazil).

4.2.2 Thermo analytical characterization

Thermo analytical characterization of ALG was obtained by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Thermogravimetry (TGA). DSC curves were obtained in a DSC-60 cell (Shimadzu Co., Japan) using aluminum pan with about 2 mg of samples, under dynamic nitrogen atmosphere (100 mL.min⁻¹). The temperature range was 25 °C to 500 °C at heating rate of 10 °C.min⁻¹. An empty aluminum pan was used as reference. The DSC cell was previously calibrated with indium and zinc.

The purity determination was performed by DSC using heating rate of 2 °C.min⁻¹ in the temperature range of 25 to 205 °C, under nitrogen atmosphere with a flow rate of 100 mL.min⁻¹. The purity was calculated in three replicates by TASYs software (Shimadzu Co., Japan).

The effect of an impurity on T_{peak} of ALG was determined by DSC using Van't Hoff equation (1).

$$T_s = T_{\text{peak}} - [(R \cdot T_{\text{peak}}^2 \cdot X_2) / \Delta H] \cdot (1/F) \quad (\text{equation 1})$$

Where T_s is the sample temperature at equilibrium (°K), T_{peak} is the melting point of the pure component (°K), R is the gas constant, X_2 is the concentration of impurity (mole fraction) and F is the fraction melting at T_s .

TGA experiments were measured on Shimadzu thermo balance TGA-50 in the temperature range of 25 °C to 600 °C, at a heating rate of 10 °C. min⁻¹, using platinum crucibles with approximately 4 mg of sample, under dynamic N₂ atmosphere (100 mL. min⁻¹). The equipment was previously calibrated with calcium oxalate standard.

4.2.3 Scanning electron microscopy/ Energy Dispersive X-ray Spectrometer (SEM/ EDS)

Morphologies of ALG API and tablets were determined by scanning electron microscopy. The particle size (n = 150 particles) of ALG API was determined. SEM images were taken using a Vega LM3/Tescan Oxford EDS Instrument. Samples were mounted with carbon adhesive on aluminum holder, covered with gold in a metallizer Quorum (Q150R ES) and photographed at a voltage of 20 kV. SEM was equipped with an Energy Dispersive X-ray Spectrometer (EDS) and SEM/EDS provided chemical micro-analysis of the field of view or spot analyses of particles.

4.2.4 Compatibility studies

ALG was mixed with main excipients used in the tablets (Nesina[®]): mannitol, microcrystalline cellulose, hydroxypropyl cellulose (HPC), croscarmellose sodium and magnesium stearate. The studies were performed by DSC, TGA, diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray powder diffraction (XRPD) and hot-stage microscopy. The last two techniques were performed if it has observed some alteration by other techniques.

DSC and TGA analysis have been performed using ALG, single excipients, binary physical mixtures formed by ALG and each excipient in a 1:1 (w/w) proportion. DSC experiments were performed in the temperature range of 25 °C to 300 °C at a heating rate of 10 °C.min⁻¹. DSC curves provide the initial melting temperature (T_{onset}), the peak temperature (T_{peak}) and the enthalpy of fusion (Δ_H). TGA analyses were performed in the temperature range of 25 °C to 300 °C, at a heating rate of 10 °C.

min^{-1} . T_{onset} of degradation was obtained by the first derivative of the TGA curves (called DTGA).

FTIR spectra of ALG and the excipients (1:1) were recorded on a Perkin-Elmer Frontier Spectrum in the range of $4,000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Data were analyzed by Spectrum[®] Software.

XRPD patterns were collected from a Bruker D2 Phaser diffractometer. The conditions of analysis were between 5° and $35^\circ 2\theta$, with slit of 0.2, rotation of 15, and a counting time of 30 s per step.

The hot stage microscopy was taken using an Olympus BX41 microscope equipped with a Mettler Toledo FP82 Hot Stage FP90 Central Processor. The rate of heating was $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. This technique was used to understand the interaction process.

4.3 Results and Discussion

4.3.1 Thermo analytical characterization

The DSC curve of ALG API shows a single sharp endothermic peak corresponding to the melting event in the range of $179.4 - 187.2 \text{ }^\circ\text{C}$ ($T_{\text{peak}} = 183.33 \text{ }^\circ\text{C}$ and $\Delta H_{\text{fusion}} = -153.48 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$), followed by a decomposition process. The literature described the melting point as being $182.5 \text{ }^\circ\text{C}$ (FDA, 2013), which is in accordance with our result. The result was confirmed by TGA, where the mass loss was 1.4% (possibly related to humidity and/or volatile impurities) until the melting process started, and after that the thermal decomposition process occurred in two stages, in the following temperature ranges and mass losses: $198.0 - 261.9 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 26.81\%$) and $348.7 - 412.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\Delta m = 54.99\%$) (Figure 4.2).

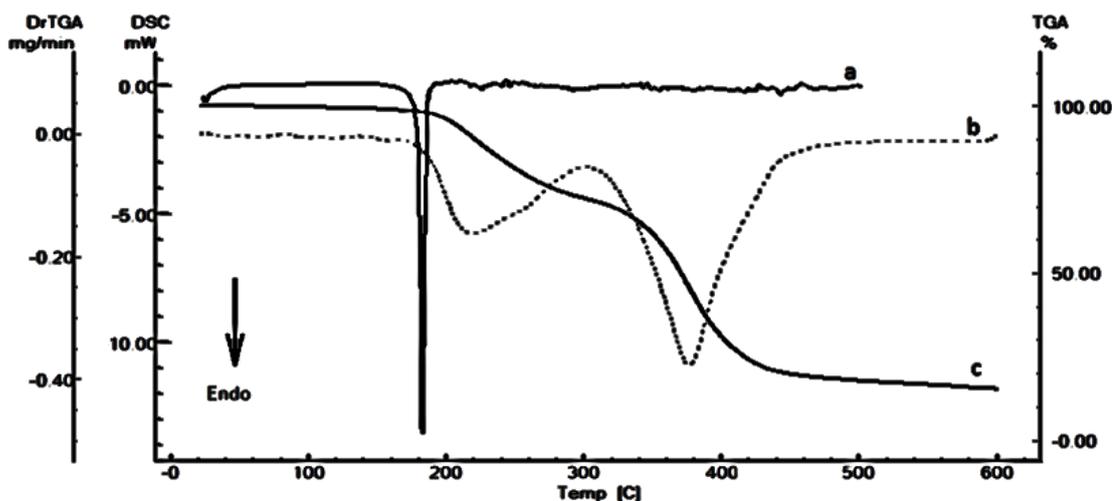


Figure 4.2 DSC (a) and DTGA/TGA (b/c) curves of ALG API under nitrogen atmosphere.

4.3.2 Purity determination

The determination of purity is based on the assumption that an impurity will depress the characteristic melting point (T_{peak}) and enthalpy of fusion (Δ_H) of a pure material. The melting transitions of a pure material, 100% crystalline, should be infinitely sharp, and impurities or defects in the crystal structure will broaden the melting range and lower the final melting point to a temperature lower than T_{peak} (GIRON, 1998a; MURA; GRATTERI; FAUCCI, 2002). Purity determination is officially listed in the United States Pharmacopoeia in general chapter of thermal analysis (UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2016).

The average purity of ALG API obtained was 98.85% (\pm RSD 0.199, $n=3$). The figure 4.3 represents one of the determinations.

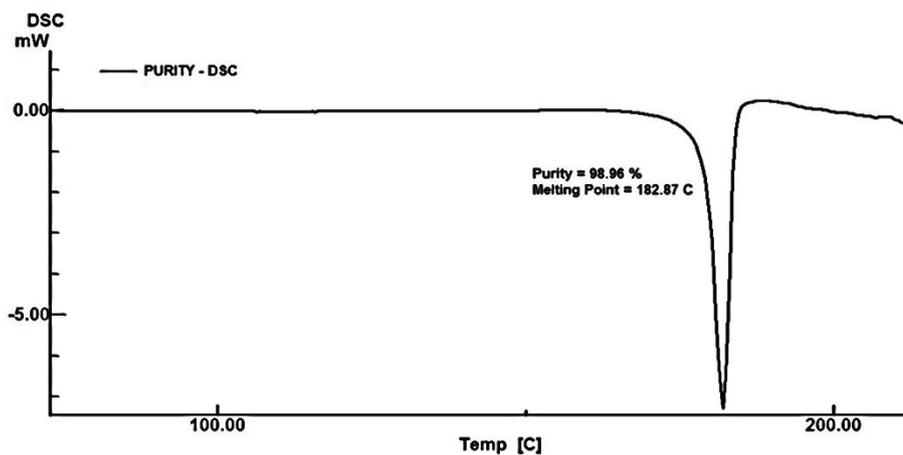


Figure 4.3 Purity determination of ALG API by DSC obtained at heating rate of 2 °C. min⁻¹ under nitrogen atmosphere.

4.3.3 Scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron microscopic photographs of ALG and tablets are shown in figure 4.4. Both drug and tablets presented an irregular crystal habit. The compression process in the tablets apparently did not alter the morphology of the drug. The particle size of ALG showed a mean of 0.249 mm (with standard deviation 0.072, minimum value of 0.127 mm and maximum value of 0.442 mm).

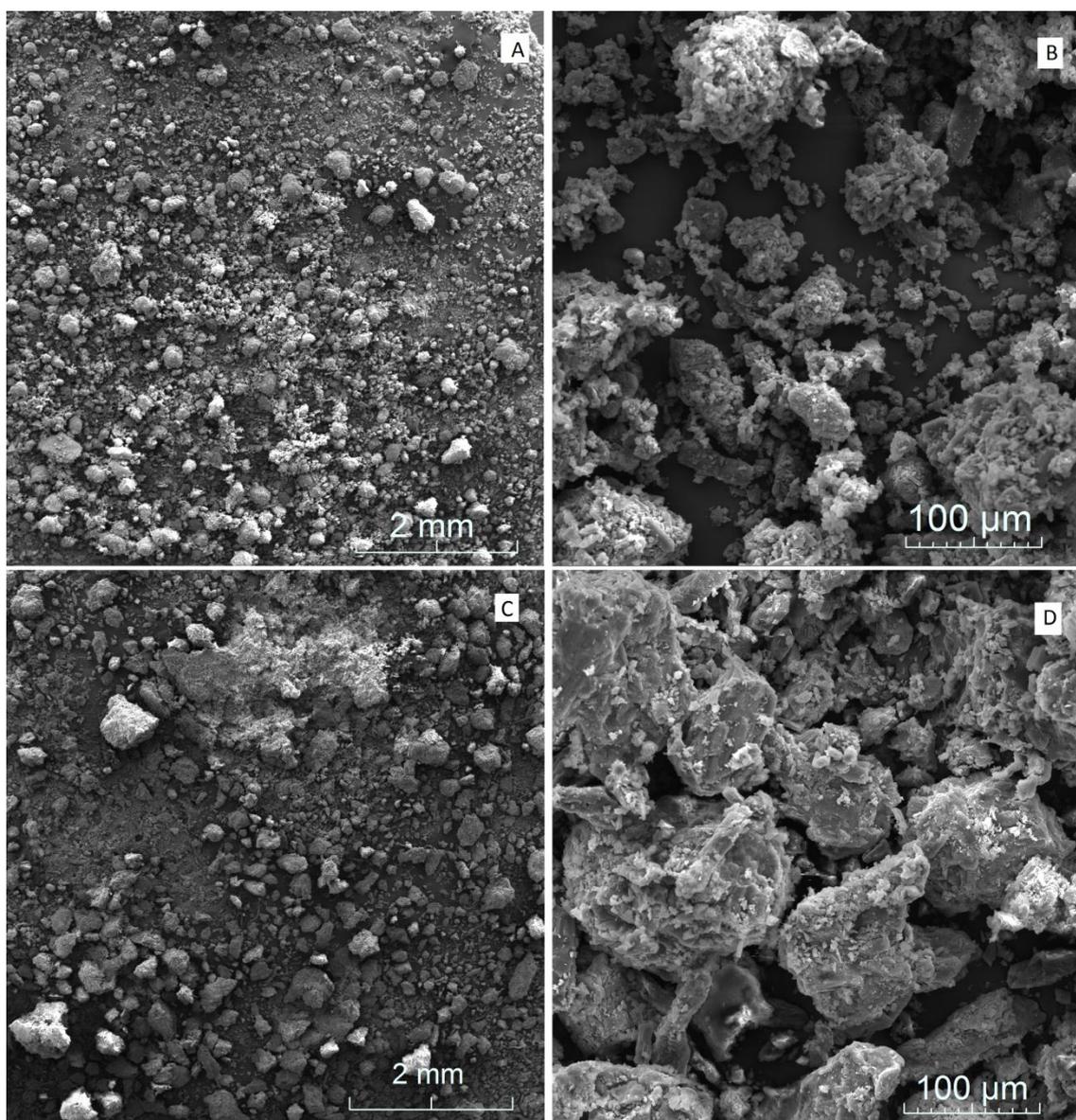


Figure 4.4 Scanning Electron Microscopic Photographs of ALG API (A, B) and tablets (C, D) at 60x and 1000x respectively.

SEM/EDS is an elemental microanalysis technique where the electron-excited characteristic X-ray peaks provide identification and quantification for all elements of the periodic table (NEWBURY; RITCHIE, 2013). The micro-analysis of SEM/EDS was performed at 15 points of the images of the ALG API and tablets. Beyond the elements carbon, nitrogen and oxygen, present in the chemical structure, copper and lead traces were also found in the API, which can be considered potential impurities that can lead to oxidation reactions. These chemical elements are not related with the synthesis process, and can be related with cross contamination or with the quality of

the material used in the synthesis. Traces of copper, sodium, and magnesium were found in the tablets, being most part of the second and third related to the excipients croscarmellose sodium and magnesium stearate.

4.3.4 Compatibility studies

The excipients used were the same described in the commercial formulation. Tablets were also evaluated. The DSC and TGA curves of tablets and binary mixtures (1:1) of API and mannitol, microcrystalline cellulose, hydroxypropyl cellulose (HPC), croscarmellose sodium and magnesium stearate are presented in figures 4.5 and 4.6, and table 4.1.

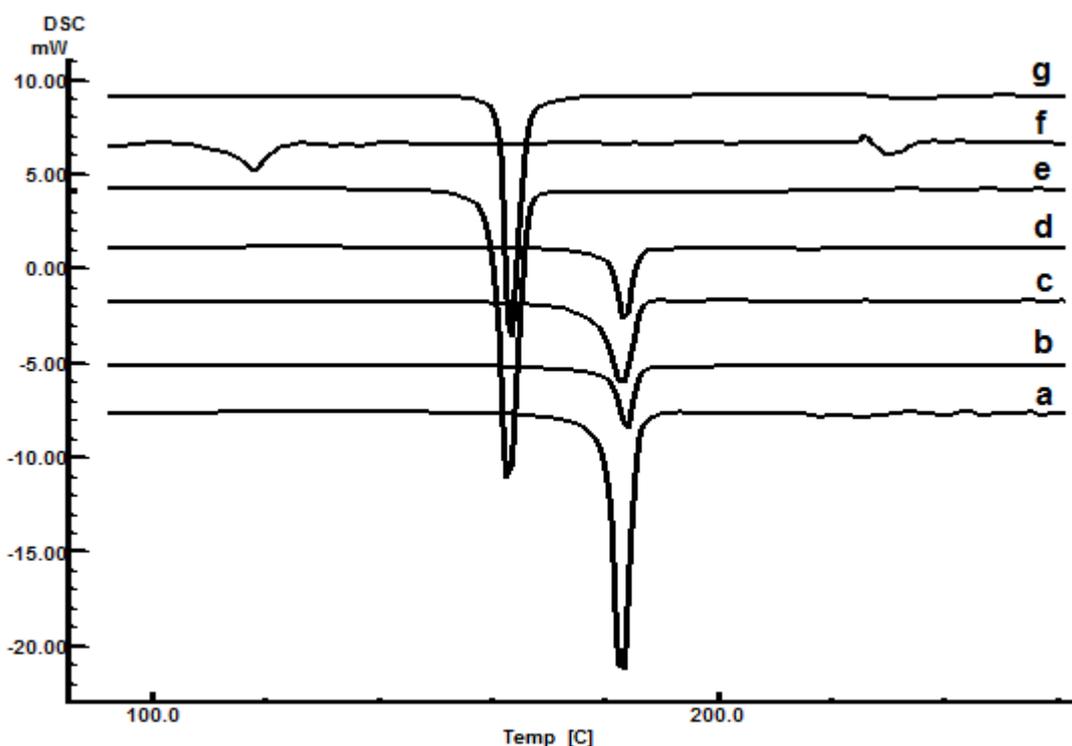


Figure 4.5 Stacked overlay of DSC curves of physical mixtures: (a) ALG API; (b) ALG/ microcrystalline cellulose; (c) ALG/ HPC; (d) ALG/ croscarmellose sodium; (e) ALG tablet; (f) ALG/ magnesium stearate; (g) ALG/mannitol.

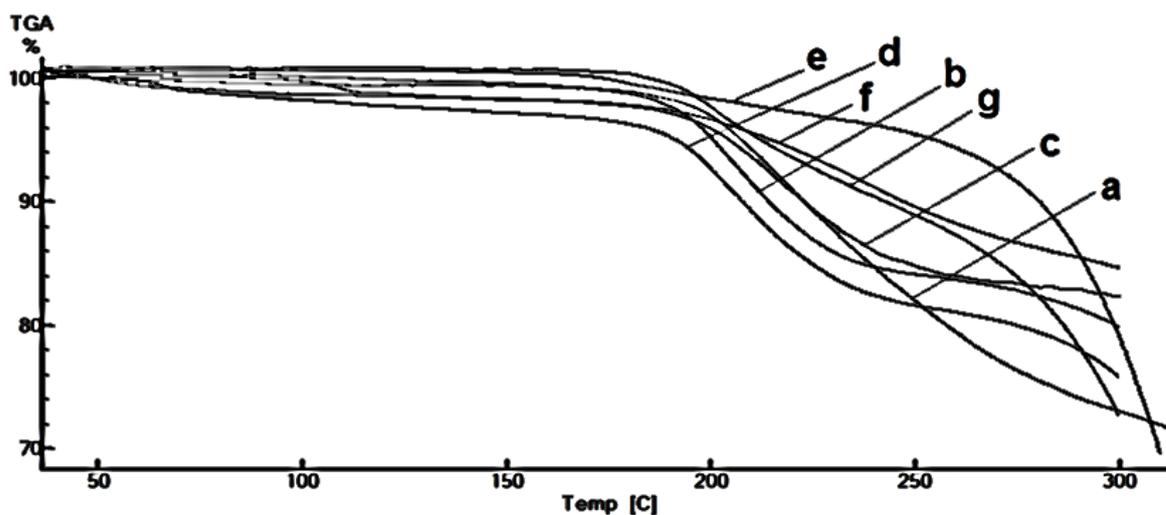


Figure 4.6 Stacked overlay of TGA curves of physical mixtures: (a) ALG API; (b) ALG/ microcrystalline cellulose; (c) ALG/ HPC; (d) ALG/ croscarmellose sodium; (e) ALG tablet; (f) ALG/ magnesium stearate; (g) ALG/mannitol.

Table 4.1 Onset and peak temperatures of fusion and onset temperature of decomposition observed in the DSC and TGA curves of ALG and binary mixtures with excipients (1:1).

Samples	DSC			TGA
	T_{onset} (fusion)/ (°C)	T_{peak} (fusion)/ (°C)	ΔH (J/g)	T_{onset} (decomposition) / (°C)
ALG API	179.45	183.33	-145.91	195.65
ALG + HPC	177.95	183.25	-75.18	195.02
ALG + Microcrystalline cellulose	180.12	184.03	-97.97	188.90
ALG + Mannitol	161.17	163.69	-177.86	187.33
ALG + Magnesium stearate	90.99*	118.03*	-33.02	202.82
ALG + Croscarmellose sodium	170.68	183.12	-73.66	189.75
Tablet	159.59	162.43	-193.24	287.06

* Undefined peak.

DSC curves showed an endothermic peak corresponding to ALG melting point followed by decomposition process in most of the mixtures (suggesting no interaction with these excipients), except with mannitol, magnesium stearate and tablets. DSC curves, in these cases, demonstrated differences in the thermal profile of ALG (figure 4.5). The melting point was early in the cases of mannitol and tablets. When mixed with magnesium stearate, ALG peak disappeared, but a little one was observed at 118.03 °C. These alterations could represent some incompatibility of chemical or physical nature. Interestingly, the initiation of decomposition process (T_{onset} of decomposition) was not displaced in neither case (figure 4.6 and table 4.1), and occurred after the melting process of ALG, demonstrating that the excipients did not accelerate these process.

The melting range of mannitol was described as being 166-168 °C (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009), and we could confirm this result when we analyzed only this excipient. In this way, ALG could be dissolved in the already melted excipient. This effect was also observed between carbamazepine and mannitol (JOSHI; PATIL; POKHARKAR, 2002).

Differences in the thermal curves of other drugs with magnesium stearate were also previously observed (AIGNER et al., 2011; OLIVEIRA; FERRAZ; MATOS, 2005; SOUSA E SILVA; SOUSA LOBO, 2010; STULZER et al., 2008; TITA et al., 2013). Magnesium stearate presents melting range at 117–150 °C (commercial samples) and 126 - 130 °C (high purity magnesium stearate) (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). The DSC curve of magnesium stearate shows two endothermic peaks at 95 °C and 113.2 °C. The first event can be attributed to the dehydration of magnesium stearate and the second was attributed to the melting of the excipient (data not showed). Magnesium stearate is a mixture of long-chain aliphatic acids with variable water content with distinct DSC profile (SOUSA E SILVA; SOUSA LOBO, 2010).

To solve the origin of these interactions other techniques were used. FTIR was used to investigate the possibility of chemical interaction between drug-excipient and to confirm the results of the thermal analysis (BUGAY, 2001).

FTIR spectrums obtained with ALG and the excipients (Fig. 4.7), showing that the characteristic bands of ALG were maintained, indicating no chemical interactions between main functional groups of the drug and these compounds. The appearance of additional bands in the spectra was related to overlap of chemical groups present in the excipients, without the absence or shift of vibration bands of ALG. Fig 4.7 - b presented additional bands in 3606.1; 3563.7; 2957.3; 2917.3; 2850.5; 2230.8; 1697.9; 1573.3; 1463.8; 1456.6; 1446; 1416.7; 1322.4; 1304.4; 1110.6; 722.07 cm^{-1} related to magnesium stearate. Fig 4.7 - c presented the alterations in baseline in 2380-2330 cm^{-1} related to HPC as well as the Fig 4.7 - d bands in 3330.6 and 1135 cm^{-1} related to croscarmellose sodium, and the Fig 4.7 - f bands in 3282.8 and 2899.2 cm^{-1} related to microcrystalline cellulose. Fig 4.7 - g presented the additional bands in 3389.2; 3277.2; 2985.5; 2970.4; 2948.5; 2902.4; 2383.4; 1260.5; 1080.7; 1017.5; 863.33; 785.83; 664.73 cm^{-1} related to mannitol. Other authors found chemical interactions between drugs containing amine and excipients that contain OH groups, such as lactose and mannitol (BERTOL et al., 2010; STULZER et al., 2008), as well as the decrease in the crystalline nature as a result of the mixture with mannitol (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2008). In this work, these events were not observed.

The main bands present in ALG (fig. 4.7 - a) are described in table 4.2. The characteristic bands of ALG were also described in patents (ANDRES; LORIMER, 2007; MAROM; RUBNOV, 2013), the first one used “crystalline form A” and “amorphous 1”, and the second one used “amorphous form” and “amorphous form I” of ALG. Crystalline form A presented bands in the FTIR spectrum at 830, 876, 910, 950, 987, 1004, 1026, 1063, 1094, 1135, 1173, 1212, 1231, 1284, 1316, 1334, 1365, 1384, 1447, 1458, 1474, 1532, 1592, 1613, 1697, 2082, 2230, 2540, 2596, 2743, 2860, 2958, 2979 e 3085 cm^{-1} (ANDRES; LORIMER, 2007), very similar with ours.

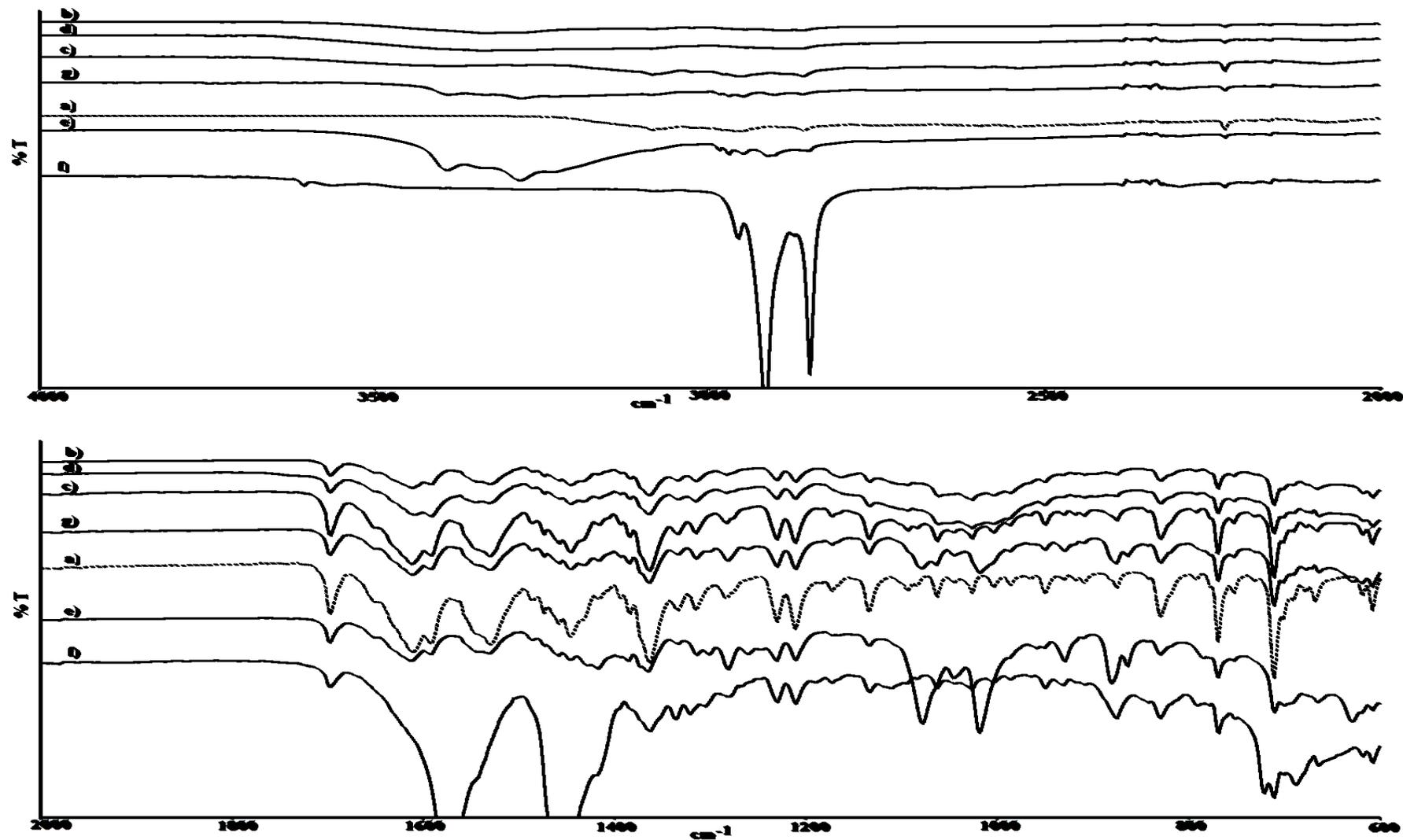


Figure 4.7 FTIR spectra of of physical mixtures: (a) ALG API; (b) ALG/ microcrystalline cellulose; (c) ALG/ HPC; (d) ALG/ croscarmellose sodium; (e) ALG tablet; (f) ALG/ magnesium stearate; (g) ALG/mannitol.

Table 4.2 The characteristics bands present in alogliptin benzoate observed in the FTIR spectrum.

Attribution	Bands (cm⁻¹)
Benzene	3072
C – H aliphatic	2861
C ≡ N (nitrile conjugated)	2230
C = O (amide)	1698
NH ₂ (amine symmetric angular deformation in the plane)	1612, 1590
C – O (carboxylic acid) (2 axial deformation bands)	1440, 1364
C – N (aliphatic amines)	1230,1212

The XRPD was used to observe the crystallinity grade of ALG, and the possibility of modifications when the drug was mixed with the excipients mannitol and magnesium stearate (figure 4.8). These excipients were selected due to the alterations observed in DSC curves. The peaks showed that ALG has a crystal pattern with distinguishing XRPD peaks at 9.28, 10.64, 11.09, 12.37, 13.83, 15.01, 17.56, 18.57, 20.75, 21.66, 23.39, 23.76, 25.67, 26.94, 29.31 2 θ . The main diffraction peaks of ALG remained unaltered in the physical mixtures, so XRPD did not evidence incompatibility between ALG and these excipients. Our XRPD peaks for ALG were similar to those described by ANDRES and LORIMER (2007). The “crystalline form A” presented peaks at 9.44, 10.84, 17.82, 18.75, 25.87 and 28.52 2 θ and the “amorphous form” showed a broad halo without specific peaks.

Both FTIR and XRPD data suggest that ALG API is similar to the crystalline form A.

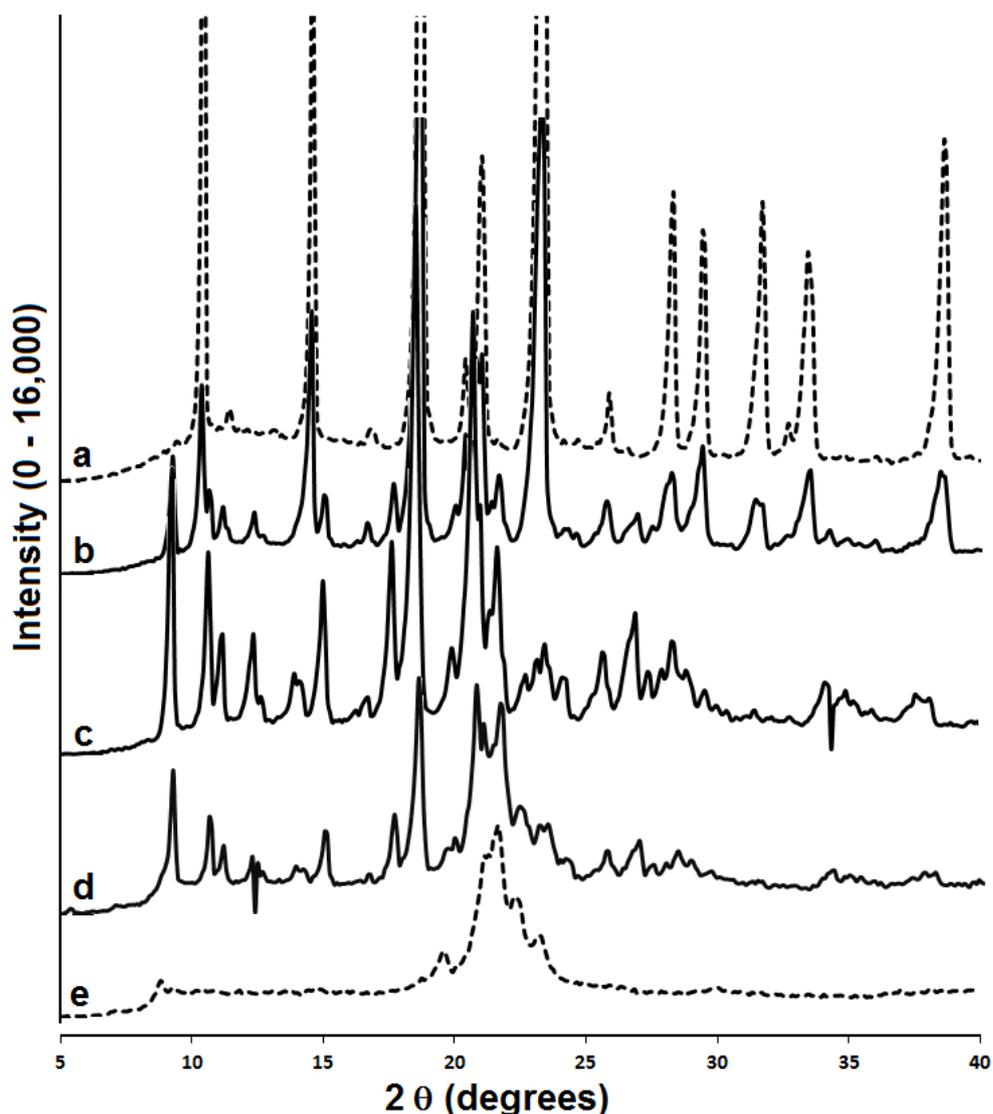


Figure 4.8 XRPD of a) mannitol; b) mixture ALG/ mannitol; c) ALG; d) mixture ALG/ magnesium stearate; e) magnesium stearate.

The changes of melting of ALG in the mixture with mannitol, magnesium stearate and tablets were investigated by hot stage microscopy, and it was possible to confirm that there were no interactions. In the mixture of ALG and mannitol, it was noted that the excipient melted before (around 165 °C), and the drug apparently dissolved in the melted excipient before melting (figure 4.9). Therefore in the DSC curve of the mixture there is an anticipation of the melting range of ALG which corresponds to the dissolution in mannitol. The same occurs with the tablets.

The mixture with magnesium stearate showed another behavior (figure 4.10). It was observed a long range of fusion (147 – 178.9 °C) represented by a slow process.

The excipient started melting before the drug, but the melting of these two compounds occurred separately. This large range of fusion explained the disappearance of the melting endotherm peak of ALG in the DSC. These results are similar to those obtained with the aceclofenac (AIGNER et al., 2011). Furthermore, the concentration of lubricant used in pharmaceutical formulations is low (0.5 – 2% w/w), which is very different from this situation (1:1). Microscopic analysis showed ALG and magnesium stearate as irregular crystals and mannitol as acicular crystals.

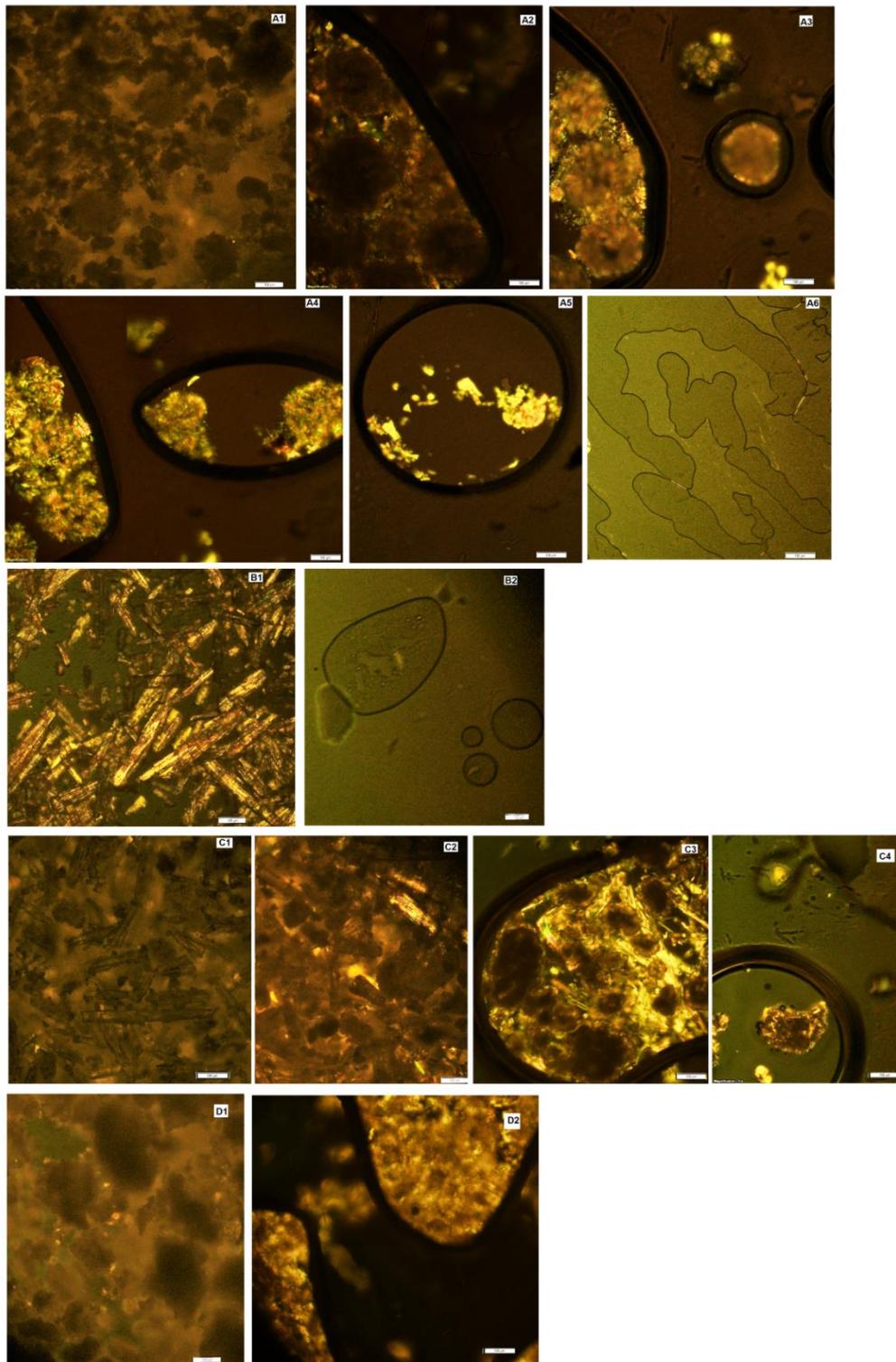


Figure 4.9 Hot stage microscopy. The melt of ALG was showed in “A”, before melt (A1), the sequence of melt process at 181.3 °C (A2 to A5) and after melt at 184 °C (A6). The mannitol is present in “B”, before (B1) and after (B2) melt at 165.3 °C. The binary mixture between ALG and mannitol are presented in “C”, before melt (C1), the start of melt at 154 °C (C2), during the melt at 165 °C (C3) and after the melt at 165 °C (C4). The tablets are presented in “D”, before melt (D1) and during the melt at 163.7 °C (D2) (400x magnification).

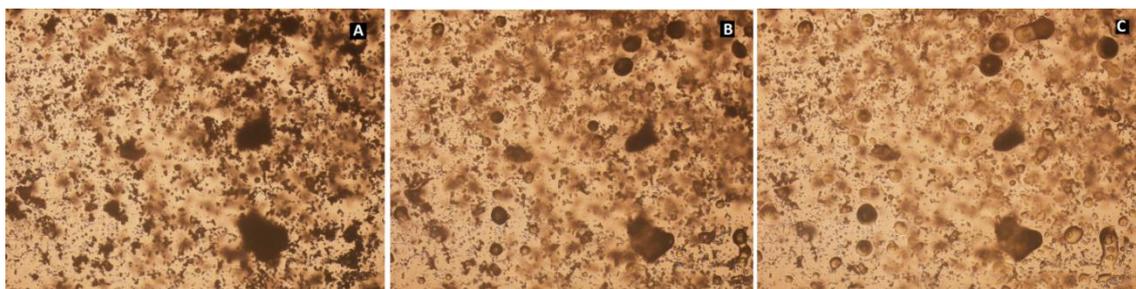


Figure 4.10 Hot stage microscopy. The binary mixture between ALG and magnesium stearate are presented, where A is before melt, B is the start of melt at 137 °C, and C is after the melt (at 178.9 °C). (100x magnification).

4.4 Conclusion

The physicochemical characterization of ALG was performed. ALG presented a melting range of 179.4 – 187.2 °C, followed by decomposition that started at 198.0 °C. The purity of ALG calculated by DSC was about 98.85 %. SEM/EDS showed the presence of copper and lead in trace amounts. The compatibility studies showed alterations in the melting behavior of ALG in the mixtures with mannitol, magnesium stearate and in the tablets when using DSC. FTIR of mixtures showed the appearance of additional bands related to the excipients. XRPD proved that ALG has a crystal form and no alterations were observed after the mixtures. The hot stage microscopy proved that interactions between mannitol and ALG, and in the tablets were due by the solubilization of the drug in the melted excipient, and the interaction between magnesium stearate and ALG is due by the melting of the compounds that occurred separately, with magnesium stearate melting before. No incompatibility was detected, and ALG was compatible with all excipients tested. These data are important to understand the characteristics, stability and compatibility of the drug, to help in the quality control of both API and tablets containing ALG as well as pre-formulation studies.

Acknowledgments

The authors thank the Departamento de Química Orgânica (IQ) of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

REFERENCES

- AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; MARKOVIC, N.; GINIC-MARKOVIC, M.; MANGAN, M.; GLASS, B. D. Compatibility studies between mannitol and omeprazole sodium isomers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 2, p. 356–360, 2008.
- AIGNER, Z.; HEINRICH, R.; SIPOS, E.; FARKAS, G.; CIURBA, A.; BERKESI, O.; SZABÓ-RÉVÉSZ, P. Compatibility studies of aceclofenac with retard tablet excipients by means of thermal and FT-IR spectroscopic methods. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 104, n. 1, p. 265–271, 2011.
- ANDRES, M.; LORIMER, K. **Polymorphs of benzoate salt of 2-[[6-[(3r)-3-amino-1-piperidinyl]-3,4-dihydro-3-methyl-2,4-dioxo-1(2h)-pyrimidinyl]methyl]-benzotrile and methods of use therefor WO 2007035372 A2**, 2007. Disponível em: <https://www.google.com/patents/WO2007035372A2?cl=en>. Acesso em: 06/02/2016.
- BERTOL, C. D.; CRUZ, A. P.; STULZER, H. K.; MURAKAMI, F. S.; SILVA, M. A. S. Thermal decomposition kinetics and compatibility studies of primaquine under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 102, n. 1, p. 187–192, 2010.
- BRUNI, G.; AMICI, L.; BERBENNI, V.; MARINI, A.; ORLANDI, A. Drug-excipient compatibility studies: Search of interaction indicators. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, n. 2, p. 561–573, 2002.
- BUGAY, D. E. Characterization of the solid-state: Spectroscopic techniques. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 48, n. 1, p. 43–65, 2001.
- DRUCKER, D. J.; NAUCK, M. A. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. **Lancet**, v. 368, n. 9548, p. 1696–1705, 2006.
- FDA, 2013. Disponível em: http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/022271Orig1s000ChemRedt.pdf. Acessado em: 25 de janeiro de 2014.
- FENG, J.; ZHANG, Z.; WALLACE, M. B.; STAFFORD, J. A.; KALDOR, S. W.; KASSEL, D. B.; NAVRE, M.; SHI, L.; SKENE, R. J.; ASAKAWA, T.; TAKEUCHI, K.; XU, R.; WEBB, D. R.; GWALTNEY, S. L. Discovery of alogliptin: A Potent, selective, bioavailable, and efficacious inhibitor of dipeptidyl peptidase IV. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 2297-2300, 2007.
- GERICH, J. DPP-4 inhibitors: What may be the clinical differentiators? **Diabetes**

Research and Clinical Practice, v. 90, n. 2, p. 131–140, 2010.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals - Part 1. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 1, n. 5, p. 191–199, 1998a.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals - Part 2. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 1, n. 6, p. 262–268, 1998b.

GUPTA, A.; KAR, H. K. Solid State Compatibility Studies of Miconazole Using Thermal and Spectroscopic Methods. **Advances in Analytical Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 51–55, 2015.

HANNA, A.; WOO, V.; YALE, J.-F.; COOKE, E. M. Incretin-based Therapies (Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonists and Dipeptidyl Peptidase - 4 Inhibitors) for the Treatment of Type 2 Diabetes. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 36, p. 9-14, 2012.

IDF. **Internation Diabetes Federation**. Disponível em:
<<http://www.diabetesatlas.org/>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

JOSHI, B. V.; PATIL, V. B.; POKHARKAR, V. B. Compatibility studies between carbamazepine and tablet excipients using thermal and non-thermal methods. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 28, n. 6, p. 687–694, 2002.

LANKAS, G. R.; LEITING, B.; ROY, R. S.; EIERMANN, G. J.; BECONI, M. G.; BIFTU, T.; CHAN, C. C.; EDMONDSON, S.; FEENEY, W. P.; HE, H.; IPPOLITO, D. E.; KIM, D.; LYONS, K. A.; OK, H. O.; PATEL, R. A.; PETROV, A. N.; PRYOR, K. A.; QIAN, X.; REIGLE, L.; WOODS, A.; WU, J. K.; ZALLER, D.; ZHANG, X.; ZHU, L.; WEBER, A. E.; THORNBERRY, N. A. Dipeptidyl peptidase IV inhibition for the treatment of type 2 diabetes potential importance of selectivity over dipeptidyl peptidases 8 and 9. **Diabetes**, v. 54, p. 2988–2994, 2005.

MAROM, E.; RUBNOV, S. **Polymorphs of alogliptin benzoate US 20130059872 A1**, 2013. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US20130059872>>. Acesso em: 01/02/2016.

MATOS, J.; OLIVEIRA, J. F.; MAGALHÃES, D.; DUBAJ, T.; CIBULKOVÁ, Z.; SIMON, P. Kinetics of ambuphylline decomposition studied by the incremental isoconversional method. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 123, n. 2, p. 1031–1036, 2016.

MURA, P.; GRATTEI, P.; FAUCCI, M. T. Compatibility studies of multicomponent tablet formulations: DSC and experimental mixture design. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 68, n. 2, p. 541–551, 2002.

NEWBURY, D. E.; RITCHIE, N. W. M. Is Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Spectrometry (SEM/EDS) Quantitative? **Scanning**, v. 35, n. 3, p. 141–168, 2013.

OLIVEIRA, G. G. G.; FERRAZ, H. G.; MATOS, J. S. R. Thermoanalytical study of glibenclamide and excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 79, p. 267–270, 2005.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**. 6th editio ed. London, Whashington: [s.n.].

SAICHO, Y. Alogliptin benzoate for the treatment of type 2 diabetes. **Vascular Health and Risk Management**, v. 11, p. 229–243, 2015.

SOUSA E SILVA, J. P.; SOUSA LOBO, J. M. Compatibility studies between nebicapone, a novel COMT inhibitor, and excipients using stepwise isothermal high sensitivity DSC method. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 102, n. 1, p. 317–321, 2010.

STULZER, H. K.; TAGLIARI, M. P.; CRUZ, A. P.; SILVA, M. A. S.; LARANJEIRA, M. C. M. Compatibility studies between piroxicam and pharmaceutical excipients used in solid dosage forms. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 42, n. 4, p. 215–219, 2008.

TELEGINSKI, L. K.; MACIEL, A. B.; MENDES, C.; SILVA, M. A. S.; BERNARDI, L. S.; de OLIVEIRA, P. R. Fluconazole-excipient compatibility studies as the first step in the development of a formulation candidate for biowaiver. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 120, n. 1, p. 771–781, 2015.

TITA, D.; JURCA, T.; FULIAS, A.; MARIAN, E.; TITA, B. Compatibility study of the acetylsalicylic acid with different solid dosage forms excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 112, n. 1, p. 407–419, 2013.

UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP), **USP 39**. Rockville, 2016.

4.5 Anexo 1: Comprovante de submissão

- JTAC-D-16-01314 - Submission Confirmation

Editorial Office Journal of Thermal Analysis and Calorimetry (JTAC) <em

Out 8 em 7:39 PM

Para Charise Dallazem Bertol

Dear Prof Bertol,

Your submission entitled "Physicochemical characterization of a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor alogliptin" has been received by Journal of Thermal Analysis and Calorimetry

The submission id is: JTAC-D-16-01314

Please refer to this number in any future correspondence.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author. The URL is <http://jtac.edmgr.com/>.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to our journal.

Kind regards,

Editorial Office
Journal of Thermal Analysis and Calorimetry

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding.

Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options.

5. CAPÍTULO II – Análise quantitativa: Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para avaliação de alogliptina em comprimidos por LC-UV e LC-CAD

Artigo publicado no periódico *Journal of AOAC International*.

DRUG FORMULATIONS AND CLINICAL METHODS

Analytical Stability-Indicating Methods for Alogliptin in Tablets by LC–CAD and LC–UV

CHARISE DALLAZEM BERTOL

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Produção de Substâncias Químicas de Referência, Ave Ipiranga No. 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre/RS, Brazil; Universidade de Passo Fundo, Instituto de Ciências Biológicas, Curso de Farmácia, Laboratório de Controle de Qualidade, Campus I, Km 292, BR 285, Bairro São José, CEP 99052-900, Passo Fundo/RS, Brazil

MARIA TEREZA FRIEDRICH

Universidade de Passo Fundo, Centro de Pesquisa em Alimentação, Laboratório de Cromatografia, Campus I, Km 292, BR 285, Bairro São José, CEP 99052-900, Passo Fundo/RS, Brazil

GRACIELA CARLOS and PEDRO EDUARDO FROELICH

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Laboratório de Produção de Substâncias Químicas de Referência, Ave Ipiranga No. 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre/RS, Brazil

Stability-indicating LC methods using a UV detector and a charged aerosol detector (CAD) simultaneously were validated for the assessment of alogliptin (ALG) in tablets. The analysis was performed on a C₈ column (250 × 4.6 mm, 5 μm) at a flow of 0.8 mL/min, using acetonitrile–10 mM ammonium acetate buffer (pH 3.5; 90 + 10, v/v) as mobile phase and UV detection at 275 nm. Validation followed the International Conference on Harmonization guidelines. The method was linear over the range of 25–200 μg/mL. Normality of the residuals showed a normal distribution, no autocorrelation, and homoscedasticity. LODs were 6.25 and 2.65 μg/mL and LOQs were 20.85 and 8.84 μg/mL for the CAD and the UV detector, respectively. The methods were precise and accurate. Excipients and degradation products did not interfere in the methods in studies of specificity. None of the factors studied in the analysis of robustness had a significant effect on the quantification of the ALG by the Pareto chart. The results of the assay obtained with LC–CAD and LC–UV were similar. The methods could be considered interchangeable and stability-indicating, and can be applied as an appropriate QC tool for analysis of ALG in tablets.

Alogliptin (ALG) is an oral hypoglycemic agent that inhibits, with high selectivity and affinity, the enzyme dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4). This inhibition avoids the degradation of incretins and potentiates the effect of these hormones (1). The gastrointestinal epithelium releases the incretins after meals and stimulates insulin secretion, preventing postprandial hyperglycemia. This mechanism responds to fluctuations in glucose in the bloodstream; however, incretins are rapidly inactivated by DPP-4 (2, 3).

ALG, chemically named 2-({6-[(3R)-3-aminopiperidin-1-yl]-3-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl}

methyl) benzonitrile, has a quinazolinone structure (1) with the formula C₁₈H₂₁N₅O₂ and a molecular mass of 339.39 g/mol. It is commercially available as the R form of its benzoate salt (C₁₈H₂₁N₅O₂·C₇H₆O₂, 461.52 g/mol; 4).

ALG was approved for clinical use in the treatment of type 2 diabetes by the U.S. Food and Drug Administration (January 2013), the European Medicines Agency (September 2013), and in Japan (April 2010), under the trade name Nesina[®] (Vipidia[®] in Europe) and, as of September 2014, it is available in 39 countries (5). This drug is not included in any pharmacopeia.

There are a few methods described in the literature for the assay of ALG in bulk and in tablet form using LC with UV detection (LC–UV) and LC–MS (6–9). In the present work, a UV detector is compared with a charged aerosol detector (CAD). The CAD is considered a universal detector, with good sensitivity, ease of operation, and constancy of response factors (10), especially for the analysis of compounds that do not ionize and those without UV chromophores (such as degradation products, impurities, and excipients). The CAD is mass dependent, and the response does not depend on the spectral or physicochemical properties of the analyte (11–13). Gas inlet pressure and the signal output range are the few controllable parameters that the CAD requires (13).

As a way of contributing to improve QC of ALG, we developed and validated a stability-indicating method for ALG in tablet form using LC–CAD and LC–UV and compared their interchangeability and ability to deal with excipients and degradation products.

Materials and Methods

Materials

ALG active pharmaceutical ingredient (API) was purchased in China (Lanospharma Laboratories Co., Ltd) and was identified and quantified by IR spectroscopy and differential scanning calorimetry (98.85 ± 0.199% RSD), respectively. Tablets (Nesina) with 25 mg ALG were purchased from the U.S. market. Acetonitrile HPLC grade was obtained from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). All other chemicals used were of analytical grade.

Received June 06, 2016. Accepted by SW September 27, 2016.
Corresponding author's e-mail: charise@upf.br, charibertol@yahoo.com.br

DOI: 10.5740/jaoacint.16-0183

Preparation of Solutions

ALG API stock solution was prepared in methanol to obtain a concentration of 1.0 mg/mL and stored under refrigeration (5°C), protected from light, and diluted to an appropriate concentration in mobile phase before use.

To prepare sample solutions, 20 tablets containing 25 mg ALG were crushed, and the contents were mixed. Fragments of coating material were removed. An appropriate amount was diluted with methanol and filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore, Bedford, MA) to the concentration of 1.0 mg/mL ALG. This solution was diluted in mobile phase before use.

LC Instrumentation and Chromatographic Conditions

Analyses were carried out using a Shimadzu LC system (Kyoto, Japan), equipped with an LC-20AT pump, DGU-14A degasser, Corona CAD Charged Aerosol Detector (ESA Bioscience, Chelmsford, MA; Dionex Corp., Sunnyvale, CA), and an SPD-10A UV detector.

Chromatography was performed on a Nano Separation Technologies C₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) in an isocratic elution mode, using acetonitrile–10 mM ammonium acetate buffer (pH 3.5) adjusted with acetic acid (90 + 10, v/v) at a flow rate of 0.8 mL/min.

Buffer was filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore). Injection volume was 20 µL. Detection was performed using the CAD at a 35 psi nitrogen gas pressure in the 100 pA detection range (ESA Nitrogen Generator) and the UV detector at 275 nm. The output signal was processed using Chromeleon 6.8 software (Dionex Corp.).

Validation

Methods were validated for linearity, LOD, LOQ, specificity, precision, accuracy, and robustness, following International Conference on Harmonization (ICH) requirements (14).

Linearity, LOD, and LOQ

Linearity was determined by constructing three analytical curves on 3 different days, each one with eight concentrations of ALG API in the range of 25–200 µg/mL prepared by the dilution of appropriate amounts of stock solution with mobile phase. Analytical curves were obtained by plotting peak areas versus the respective concentrations. The results were subjected to analysis of variance (ANOVA; using the Portal Action supplement), and the goodness-of-regression model was evaluated by correlation coefficient regression significance, lack-of-fit, and residuals analysis. Residuals were examined to verify normality (Anderson-Darling, Shapiro-Wilk, and Ryan-Joiner tests), no autocorrelation (Durbin-Watson test), and homoscedasticity (equality or homogeneity of variance; Cochran test).

LODs and LOQs were evaluated using the mean values of three independent analytical curves, and were determined by a linear regression model using the following equations: LOD = (3.3 σ)/S and LOQ = (10 σ)/S, where 3.3 and 10 correspond to the factors of LOD and LOQ, respectively; σ = the SD of the response; and S = the slope obtained in the linearity study (14).

Specificity

Specificity was assessed through the influence of excipients by comparing the chromatograms obtained from ALG and placebo solution (containing microcrystalline cellulose, sodium croscarmellose, hydroxypropyl cellulose, mannitol, and magnesium stearate present in tablet formulation, without the drug). Benzoic acid and mannitol were also tested. These solutions were prepared with methanol at the concentration of 1.0 mg/mL, filtered, and diluted in mobile phase before use.

To assess the stability-indicating capability of the method with the UV detector and the CAD, ALG API solution (500 µg/mL) was subjected to stress conditions. Acidic, basic, thermal, oxidative, and photolytic conditions were evaluated.

The acidic condition was obtained by treating the API solution with 2 M formic acid at 65°C for 235 h. The study of the alkaline condition was done using 0.1 M ammonium hydroxide at 25°C for 24 h. Thermal degradation was evaluated by submitting the API solution to 65°C for 235 h. Oxidative degradation was obtained by treating the API solution with 6% hydrogen peroxide at 25°C for 24 h. For the photolytic studies, the API solution was subjected to a UV light chamber (1.0 × 0.17 × 0.17 m) at long-wave UV light (Black-light blue lamp; Orion, 30 W, 130 V, at 352 nm) for 15 days at room temperature. The chamber wall was covered with mirrors to achieve light uniformity. In all cases, blank solutions were evaluated. After stress, pH was adjusted and solutions were diluted in mobile phase at the concentration of 100 µg/mL.

Precision and Accuracy

Precision and accuracy analyses were performed by adding known amounts of ALG API solution to the tablet solution to achieve three final concentrations (80, 100, and 120 µg/mL). Each level was made in triplicate. Repeatability (intraday) was evaluated during the same day, under the same experimental conditions. The same procedure was used for intermediate precision (interday) on 3 different days. Precision was evaluated by RSD and by the Horwitz ratio (HorRat) equation (15):

$$\text{HorRat} = \text{RSD}_r / \text{RSD}_I \text{ from Horwitz}$$

The RSD_r is based on collaborative studies from the literature, i.e., the theoretical values of repeatability can be obtained from the Horwitz function. This function proposes that as the analyte concentration decreases by 2 orders of magnitude, the SD increases by a factor of 2. It is only dependent on concentration (16). The RSD_r from Horwitz was calculated using the equation $\text{RSD}_r = 2^{(1 - 0.5 \log C)}$, where C = the concentration expressed as mass fraction.

Values ≤ 2 in the HorRat equation are considered adequate (17). The results obtained on different days were compared by the Student *t*-test. Accuracy was calculated as the percentage of ALG recovered.

Robustness

The robustness was measured employing a Plackett–Burman design using three factors at three levels, which allows screening a relatively large number of factors in a relatively

Table 1. Factors and levels evaluated in the robustness of methods

Factors	Levels		
	Low	Optimal	High
Flow, mL/min	0.7	0.8	0.9
Organic concentration, %	89	90	91
pH	3.3	3.5	3.7

small number of experiments (18). The factors investigated were pH, composition, and flow rate of the mobile phase. Each factor consists of one high and one low level (Table 1). The combination of these factors was calculated (software Minitab[®] v. 17), resulting in 15 experiments. The two methods were evaluated via the assay of ALG tablets using ALG API solution, under the same experimental conditions and both at the concentration of 100 µg/mL.

Method Comparison

According to the U.S. Pharmacopeia (19), the comparison of two methods determines whether their average results or their variability differ by an amount that is deemed important. Method equivalence could be assessed by the analysis of precision (18). The methods were compared using the Student *t*-test.

Results and Discussion

Method Validation

Optimization of chromatographic conditions.—Chromatographic conditions were optimized to provide simple, fast, and reliable LC methods to analyze ALG tablets using the CAD and the UV detector. Two kinds of stationary phases (C₁₈ and C₈) were evaluated. The best performance for an ALG peak was obtained with a C₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm). During the choice of the mobile phase, we considered that the response of the CAD is influenced by the proportion of organic content and the mobile phase composition (20, 21). A higher content of organic solvent increases the transport efficiency of the nebulizer (increasing the analyte delivered for detection) and, consequently, the response of the detector (20–23). Isocratic elution is preferred in the analysis of a single substance. Furthermore, the response of the CAD increases with the increase of organic solvent in the mobile phase, which may be a problem when using gradient elution (20).

ALG is a basic substance with a pK_a of 9.47 (24). At pH 3.5, the amine group from the aminopiperidinic ring is in the ionized form. The mobile phase consisting of 10 mM ammonium acetate buffer (pH 3.5)–acetonitrile (10 + 90, v/v) was chosen because it allowed an adequate running time, providing selectivity and sensitivity, and ALG was properly analyzed in the presence of its major degradation products. ALG retention time was around 8.5 min.

Linearity, LOD, and LOQ.—A linear correlation between ALG concentration and detector response was in the range of 25–200 µg/mL for both detectors. Some authors have commented that the relationship between the amount of analyte and the signal could not be directly linear over a wide

concentration range using the CAD, so they used a narrow range of concentration or they plotted the curve in a logarithmic coordinate system ($y = ax^b$, where y = the peak area, x = the concentration, a = the slope, and b = the exponential, which depends on chromatographic conditions; 13, 20, 25–28). In this case, however, a good and linear relation between concentration and response was found for both detectors, as revealed by ANOVA. The correlation coefficient was higher than 0.99 using both detectors (CAD: $r = 0.9991$, $y = 0.1205x + 2.3569$; and UV detector: $r = 0.9996$, $y = 0.6654x - 4.4078$).

Residuals were evaluated with respect to normality (Anderson-Darling, Shapiro-Wilk, and Ryan-Joiner tests), no autocorrelation (Durbin-Watson test), and homoscedasticity/homogeneity (Cochran test), and showed a normal distribution, independence, and homoscedasticity (Table 2).

LODs were 6.25 and 2.65 µg/mL and LOQs were 20.85 and 8.84 µg/mL for the CAD and the UV detector, respectively, indicating the adequate sensitivity of both detectors.

Specificity.—Excipients present in ALG tablets did not interfere in the analysis using the CAD and the UV detector, as shown in Figure 1. The chromatogram of ALG tablets with the CAD showed an additional peak related to the excipient mannitol (not observed with the UV detector). Among the excipients present in the tablets, mannitol was the one soluble in methanol. Therefore, we tested a solution containing this excipient and verified that the extra peaks observed in tablet solution with the CAD was mannitol; it was not observed with the UV detector because it has no chromophore group. Both detectors showed a peak at 3.8 min related to benzoic acid because ALG is in the benzoate salt form.

The specificity of the method was also determined by subjecting the API solution to forced degradation under acid, alkaline, thermal, oxidative, and photolytic conditions (Figures 2 and 3).

Under all conditions, the decrease in ALG concentration was about 40%. After acid degradation, two extra peaks were observed with the CAD and the UV detector. One peak was observed early in the run and the other after the ALG peak. However, the first peak observed with the CAD was at

Table 2. Requirements assessed for the LC–UV and LC–CAD method validations

Parameter	Statistical test	Calculated value	
		LC–CAD	LC–UV
Regression (ANOVA)	<i>P</i> value ^a	1.03547E-25 ^b	5.9059E-38 ^b
Lack-of-fit (ANOVA)	<i>P</i> value ^a	0.0136 ^b	1.1872E-06 ^b
Autocorrelation (Durbin-Watson)	<i>P</i> value ^a	0.0148 ^b	0.0344 ^b
Homoscedasticity (Cochran) ^c	Cochran	0.2620	0.462
Normality test	Anderson-Darling <i>P</i> value ^d	0.2927 ^b	0.4171 ^b
	Shapiro-Wilk <i>P</i> value ^d	0.3753 ^b	0.37729 ^b
	Ryan-Joiner <i>P</i> value ^d	0.4350 ^b	0.5291 ^b

^a *P* < 0.05.

^b Statistical significance.

^c Critical value for the Cochran test (8, 3): 0.5157 (α = 5%).

^d *P* > 0.05.

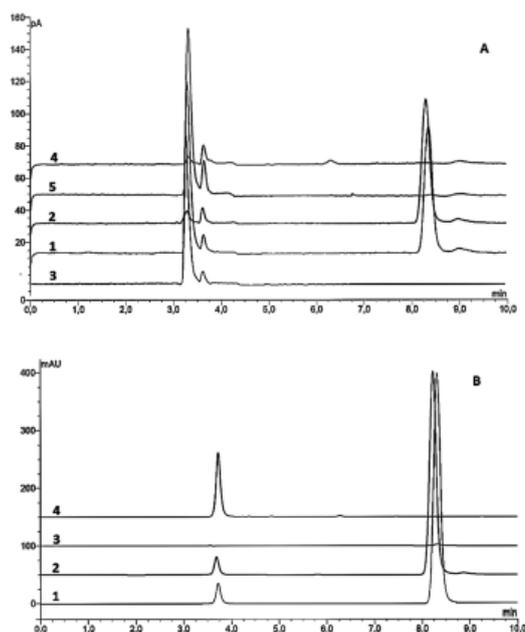


Figure 1. Chromatograms using (A) the CAD and (B) the UV detector (275 nm). 1 = ALG tablets 100 µg/mL, 2 = ALG API 100 µg/mL, 3 = placebo solution 100 µg/mL, 4 = benzoic acid 100 µg/mL, and 5 = mannitol 100 µg/mL. mAU, milli-absorbance unit.

2.3 min compared to 3.5 min with the UV detector, suggesting two different compounds. In the basic condition, no extra peaks were observed with either detector. Under the thermal condition, one degradation peak was observed after the elution of ALG in both detectors, with a retention time of 8.8 min, similar to the peak observed in the acid condition. The acid and thermal hydrolysis conditions involved heating at 65°C for 265 h, so this peak could be related to the heat. No extra peaks were observed after oxidation. Under the photolytic condition, one degradation peak at 2.4 min using the CAD and one peak at 3.7 min using the UV detector were observed, similar to those observed after acid degradation.

ALG presented good stability in acid and neutral conditions, because a temperature of 65°C for 265 h had to be used to achieve some degradation, as well as under photolysis, in which it took 15 days of exposition to achieve some degradation. Considering that ALG was degraded only under strong stress conditions, it can be considered very stable under normal storage conditions.

The degradation peaks were similar using both detectors, with some differences found in the acid and photolytic conditions. In addition, the CAD showed peaks related to the degradation agent or solvent used (observed in blank solutions). The impurities present in the solvents are mainly due to signals observed in the blank used with the CAD (20). Both detectors were capable of detecting the drug among four degradation products.

Precision and accuracy.—The results (Table 3) show an acceptable range, as recommended by the ICH (14). ALG

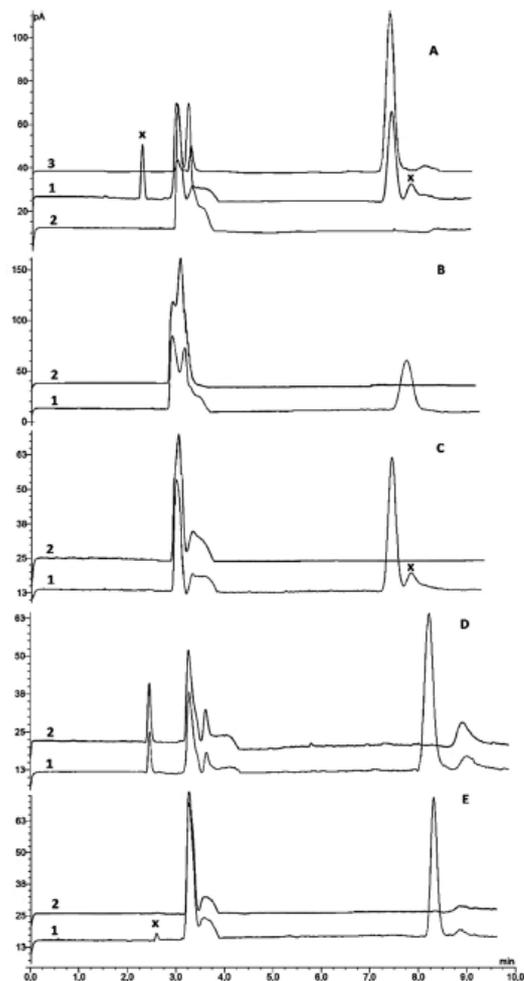


Figure 2. Degradation of ALG API assessed by LC-CAD. (A) Acid hydrolysis (2 M formic acid, 235 h, 65°C); (B) basic hydrolysis (0.1 M ammonium hydroxide, 24 h, 25°C); (C) thermal hydrolysis (water, 235 h, 65°C); (D) oxidation (6% H₂O₂, 24 h, 25°C); and (E) photolysis (UV light at 352 nm, 15 days). 1 = ALG submitted to degradation conditions, 2 = blank solution, 3 = ALG without degradation, and X = degradation product.

recovery was between 100 and 103% for both detectors. The HorRat equation showed values ≤ 2 . The Student *t*-test provided *P* values lower than *t*_{critical} in all cases. The methods were considered precise and accurate.

Robustness.—Robustness response is demonstrated by a Pareto chart of the effects that determine the magnitude and the importance of each effect. The chart displays, in the bars, the absolute value of the effects and draws a vertical line that represents the critical *t*-value ($\alpha = 5\%$). The effect is not significant when its bar does not overtake the vertical lines. As shown in Figure 4, none of the factors studied had a significant effect on the quantification of the ALG using the CAD and the UV detector, demonstrating the robustness of the method. The

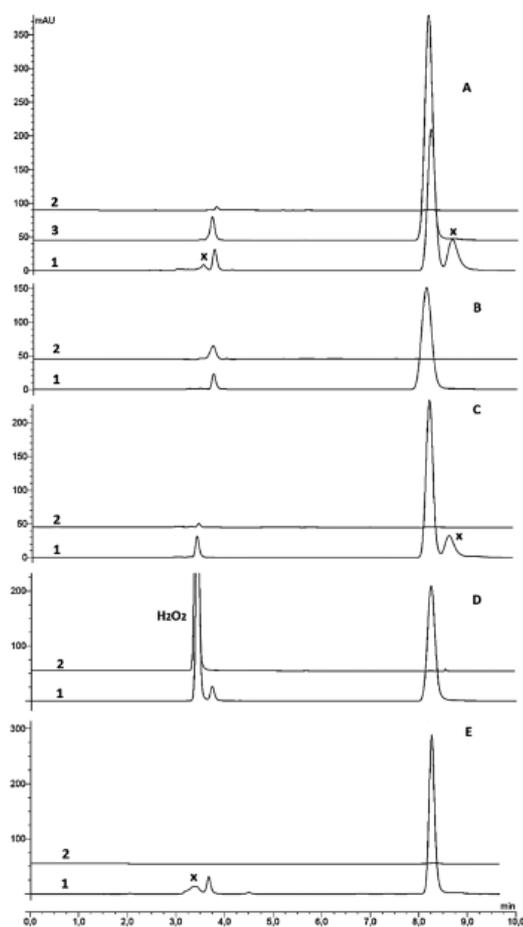


Figure 3. Degradation of ALG API assessed by LC-UV at 275 nm. (A) Acid hydrolysis (2 M formic acid, 235 h, 65°C); (B) basic hydrolysis (0.1 M ammonium hydroxide, 24 h, 25°C); (C) thermal hydrolysis (water, 235 h, 65°C); (D) oxidation (6% H₂O₂, 24 h, 25°C); and (E) photolysis (UV light at 352 nm, 15 days). 1 = ALG submitted to degradation condition, 2 = blank solution, and 3 = ALG without degradation.

average value found in the assay of ALG in tablets (\pm RSD) was $100.12 \pm 0.76\%$ for LC-CAD and $100.27 \pm 0.87\%$ for LC-UV, as shown in Table 4.

Method comparison.—Methods were considered interchangeable because no difference was detected between them ($t_{\text{calculated}} = 0.194 < t_{\text{critical}} = 0.850$).

Conclusions

LC methods using a CAD and a UV detector provided good results in terms of linearity, LOD, LOQ, accuracy, precision, robustness, and specificity, without any interference from excipients or degradation products in the analyte peak. Both methods were fully validated and provide an appropriate QC tool for routine analysis and stability assays of ALG in

Table 3. Repeatability/intermediate precision and accuracy of methods for determination of ALG tablet solutions prepared by ALG API addition

Method	Level, $\mu\text{g/mL}$	Recovery \pm RSD, % ^a			Mean interday \pm RSD, %
		Day 1	Day 2	Day 3	
CAD	80.0	100.23 \pm 2.84	100.56 \pm 2.04	100.88 \pm 1.99	100.56 \pm 0.32
	100.0	102.06 \pm 2.21	101.62 \pm 1.51	101.23 \pm 1.68	101.64 \pm 0.41
	120.0	103.27 \pm 1.70	100.32 \pm 1.17	101.55 \pm 2.88	101.71 \pm 1.46
	Mean intraday \pm RSD, %	101.85 \pm 1.50	100.83 \pm 0.69	101.22 \pm 0.33	
UV	80.0	101.49 \pm 1.81	101.89 \pm 1.77	101.95 \pm 0.49	101.78 \pm 0.25
	100.0	100.38 \pm 0.81	101.94 \pm 1.97	101.36 \pm 0.84	101.23 \pm 0.78
	120.0	101.30 \pm 1.41	101.47 \pm 0.32	101.27 \pm 0.22	101.35 \pm 0.11
	Mean intraday \pm RSD, %	101.06 \pm 0.59	101.77 \pm 0.25	101.53 \pm 0.36	

^a Mean of three replicates.

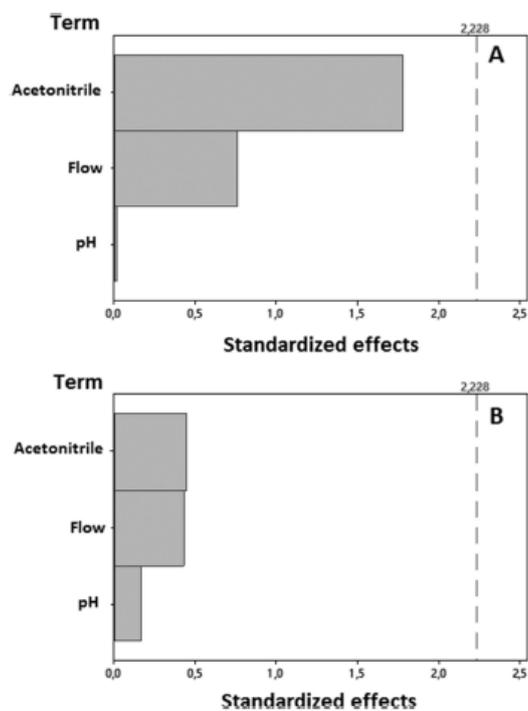


Figure 4. Pareto chart (Minitab 17) of standardized effects (response in assay, $\alpha = 5\%$) obtained for the robustness assay of ALG in tablets for (A) CAD and (B) UV detector.

tablets. The results show that the LC-CAD and the LC-UV methods developed and validated are interchangeable over the concentration range studied.

Table 4. Robustness assay results of ALG tablets for the LC–CAD and LC–UV methods

Experiment	UV assay, %	CAD assay, %
1	101.10	99.44
2	101.86	100.36
3	101.33	101.96
4	100.91	99.84
5	100.36	99.82
6	100.56	100.45
7	100.98	100.99
8	99.23	100.63
9	99.75	99.80
10	99.65	99.70
11	100.05	99.43
12	98.45	100.71
13	99.50	99.47
14	100.06	99.43
15	100.27	99.72
Mean ^a	100.27	100.12
RSD, %	0.887	0.725

^a Mean of 15 replicates.**References**

- Feng, J., Zhang, Z., Wallace, M.B., Stafford, J.A., Kaldor, S.W., Kassel, D.B., Navre, M., Shi, L., Skene, R.J., Asakawa, T., Takeuchi, K., Xu, R., Webb, D.R., & Gwaltney, S.L. (2007) *J. Med. Chem.* **50**, 2297–2300. doi:10.1021/jm070104l
- Gerich, J. (2010) *Diabetes Res. Clin. Pract.* **90**, 131–140. doi:10.1016/j.diabres.2010.07.006
- Hanna, A., Woo, V., Yale, J., & Cooke, E.M. (2012) *Can. J. Diabetes* **36**, 9–14. doi:10.1016/j.jcjd.2012.01.005
- U.S. Food and Drug Administration (2013) Center for Drug Evaluation and Research, Application No.: 022271Orig1s000, http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2013/022271Orig1s000OtherRedt.pdf (accessed on November 22, 2015)
- Saicho, Y. (2015) *Vasc. Health Risk Manag.* **11**, 229–243
- El-Bagary, R.I., Elkady, E.F., & Ayoub, B.M. (2012) *Int. J. Biomed. Sci.* **8**, 215–218
- Kumar, A.P., Aruna, G., Rajasekar, K., & Reddy, P.J. (2013) *Int. Bull. Drug Res.* **3**, 58–68
- Sri, G.S., Kumar, S.A., Saravanan, J., Debnath, M., Greeshma, V., & Krishna, N.S. (2013) *IJPR* **3**, 9222–9241
- Zhang, K., Ma, P., Jing, W., & Zhang, X. (2015) *Asian J. Pharm. Sci.* **10**, 152–158
- Dixon, R.W., & Peterson, D.S. (2002) *Anal. Chem.* **74**, 2930–2937. doi:10.1021/ac011208l
- Gamache, P.H., McCarthy, R.S., Freeto, S.M., Asa, D.J., Woodcock, M.J., Laws, K., & Cole, R.O. (2005) *LC GC N. Am.* **23**, 150–161
- Nováková, L., Lopéz, S.A., Solichová, D., Satinský, D., Kulichová, B., Horna, A., & Solich, P. (2009) *Talanta* **78**, 834–839. doi:10.1016/j.talanta.2008.12.057
- Vehovec, T., & Obreza, A. (2010) *J. Chromatogr. A* **1217**, 1549–1556. doi:10.1016/j.chroma.2010.01.007
- ICHHT Guideline (2005) *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)*, International Conference on Harmonization Geneva, Switzerland, http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf (accessed on February 10, 2016)
- Wood, R. (1999) *TrAC, Trends Anal. Chem.* **18**, 624–632. doi:10.1016/S0165-9936(99)00150-8
- Horwitz, W. (1982) *Anal. Chem.* **54**, 67–76. doi:10.1021/ac00238a002
- Instituto Nacional de Metrologia N e QI (2011). *Coordenação Geral de Acreditação Orientação sobre validação de métodos analíticos*, DOQ-CGCRE-008 rev 04, pp. 1–20. http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf (accessed on January 24, 2016)
- Vander Heyden, Y., Nijhuis, A., Smeyers-Verbeke, J., Vandeginste, B.G.M., & Massart, D.L. (2001) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **24**, 723–753. doi:10.1016/S0731-7085(00)00529-X
- U.S. Pharmacopeial Convention (2011). *The U.S. Pharmacopeia (USP 34), National Formulary (NF 29), Analytical Data: Interpretation and Treatment (1010)*, Rockville, MD
- Górecki, T., Lynen, F., Szucs, R., & Sandra, P.U. (2006) *Anal. Chem.* **78**, 3186–3192. doi:10.1021/ac060078j
- Vervoort, N., Daemen, D., & Török, G.P. (2008) *J. Chromatogr. A* **1189**, 92–100. doi:10.1016/j.chroma.2007.10.111
- Almeling, S., Ilko, D., & Holzgrabe, U. (2012) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **69**, 50–63. doi:10.1016/j.jpba.2012.03.019
- Cohen, R.D., Liu, Y., & Gong, X. (2012) *J. Chromatogr. A* **1229**, 172–179. doi:10.1016/j.chroma.2012.01.036
- Chemicalize (2015) Alogliptin, <http://www.chemicalize.com> (accessed on December 16, 2015)
- Holzgrabe, U., Nap, C.J., Kunz, N., & Almeling, S. (2011) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **56**, 271–279. doi:10.1016/j.jpba.2011.05.027
- Bernardi, R.M., D'Avila, F.B., Todeschini, V., Fröhlich, P.E., & Bergold, A.M. (2013) *Anal. Methods* **5**, 4777–4784. doi:10.1039/c3ay40938d
- Stypulkowska, K., Blazewicz, A., Fijalek, Z., Warowna-Grzeskiewicz, M., & Srebrzynska, K. (2013) *J. Pharm. Biomed. Anal.* **76**, 207–214. doi:10.1016/j.jpba.2012.12.025
- Carlos, G., Comiran, E., de Oliveira, M.H., Limberger, R.P., Bergold, A., & Fröhlich, P.E. (2015) *Arab. J. Chem.* **69**, in press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2015.06.001>

6. CAPÍTULO III – Estudo de estabilidade térmica do fármaco ALG

6.1 Introdução

O estudo da estabilidade desempenha papel essencial no processo de desenvolvimento de fármacos. Muitos fármacos estão sujeitos a reações de decomposição química ou física, que levam à perda da potência e mudanças físicas nas formulações. Mudanças na estabilidade podem trazer riscos à segurança do paciente, pois a quantidade de fármaco pode ser menor que a esperada, assim como pode haver a formação de produtos tóxicos (BAJAJ et al., 2012; HUYNH-BA, 2009).

Estudos de estabilidade acelerados consideram a decomposição de fármacos ou produtos farmacêuticos usando temperaturas elevadas (temperaturas acima de 80 °C por 2-3 semanas, e umidade relativa acima de 90%) e estima-se a estabilidade em baixas temperaturas, utilizando para isso modelos matemáticos (CLANCY et al., 2016).

Estes estudos não substituem os estudos de estabilidade necessários para o registro do medicamento perante as agências regulatórias, porém são utilizados para entender o processo de degradação auxiliando no desenvolvimento de formulações estáveis (CLANCY et al., 2016). Conforme a legislação brasileira, os estudos de estabilidade podem ser: acelerado (6 meses em condições mais drásticas de temperatura e umidade), de longa duração (24 meses) e de acompanhamento (a cada 12 meses), e devem ser realizados na embalagem primária. Para fins de registro, é concedido um prazo de validade provisório de 12 meses se a degradação for maior que 5% e de 24 meses se a degradação for menor ou igual a 5% (BRASIL, 2005).

Antes de prever o tempo de estocagem de uma formulação é fundamental determinar a cinética de degradação do fármaco. A ordem da reação é feita de acordo com o número de espécies que estão reagindo. Na reação de ordem zero, a velocidade de degradação independe da concentração dos reagentes, na reação de primeira ordem, a velocidade de reação é determinada pela concentração de um dos reagentes e na de segunda ordem, pelas concentrações de dois reagentes. A ordem de reação pode ser determinada medindo-se a quantidade de fármaco remanescente ao longo do tempo, ou pela dosagem de um dos produtos da decomposição (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

A base científica para modelar os resultados fundamenta-se nas equações cinéticas de Arrhenius para ajustar e obter as melhores previsões de degradação afetadas pela temperatura e umidade (ALSANTE et al., 2007; BLESSY et al., 2014; CLANCY et al., 2016; KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

A velocidade de uma reação pode ser definida de acordo com a quantidade remanescente de fármaco, onde a concentração inicial do fármaco está representada por A (mol/L), e a concentração que reagiu no tempo t como x (mol/L), conforme a equação 1 (FLORENCE; ATTWOOD, 2011):

Equação 1:

$$-\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d(a-x)}{dt} = \frac{dx}{dt}$$

O termo “a” é uma constante, e desaparece durante a diferenciação, portanto dx/dt descreve a velocidade da reação. Assumindo que quando um fármaco A reage com um reagente B, entrarão em colisão, a velocidade de reação (dx/dt) será proporcional à concentração das duas moléculas reagentes (equação 2) (FLORENCE; ATTWOOD, 2011; BALL, 2006):

Equação 2:

$$\frac{dx}{dt} = K \cdot [A] \cdot [B]$$

Onde K representa a constante de velocidade.

Esta resposta representa uma reação de segunda ordem, visto que a ordem da reação é a soma dos expoentes dos termos de concentração na equação de velocidade. Quando a velocidade da reação depende apenas de A, a reação será primeira ordem, ou também chamada de pseudo primeira ordem. E, se a velocidade da reação é constante, essa reação é de ordem zero e a equação será escrita conforme a equação 3 (FLORENCE; ATTWOOD, 2011; BALL, 2006):

Equação 3:

$$\frac{dx}{dt} = K_0$$

A umidade, a presença de excipientes, a temperatura, a luz e o oxigênio estão entre os fatores que influenciam a estabilidade de sólidos. A umidade exerce efeito principalmente em fármacos solúveis em água (BAJAJ et al., 2012; KOMMANABOYINA; RHODES, 1999).

A influência da temperatura na degradação de fármacos normalmente é realizada em altas temperaturas (em períodos de tempo mais curtos) quando as velocidades de degradação são maiores e mais facilmente observadas (BLESSY et al., 2014). A equação de Arrhenius (equação 4) descreve o efeito da temperatura sobre a decomposição e permite calcular a velocidade de degradação do fármaco à temperatura ambiente a partir de medidas em altas temperaturas (BALL, 2006):

Equação 4:

$$\ln K = \ln A + \left(-\frac{E_a}{R}\right) \cdot \left(\frac{1}{T}\right)$$

E_a é a energia de ativação, barreira que deve ser vencida se houver reação quando duas moléculas reagentes colidem. A é o fator de frequência que se assume ser independente da temperatura. R é a constante dos gases (8,314 J/mol) e T é a temperatura em graus Kelvin.

O modelo de Arrhenius fornece a velocidade da reação e prevê a estabilidade em qualquer temperatura com o conhecimento da energia de ativação (DUNCAN; ZARETSKY, 2011). Entretanto, o valor da E_a no estado sólido não tem o mesmo significado que no estado líquido.

Outras técnicas experimentais que possibilitam a determinação da velocidade de decomposição a partir de um único ou poucos experimentos têm sido utilizadas. Os métodos envolvem aumento de temperatura em um programa com tempo e temperatura pré-determinados. A calorimetria exploratória diferencial (DSC) e a termogravimetria (TGA) têm sido muito utilizadas, porém as reações no estado sólido são complexas e os resultados obtidos nem sempre são fáceis de interpretar (GIRON, 1998a). A TGA é uma técnica que avalia as mudanças de perda de massa na amostra em uma termobalança em função da temperatura e/ou tempo. Os equipamentos

também fornecem a 1ª derivada das curvas TGA (DTGA), que representa a taxa de mudança de massa (dm/dt) (GIRON, 1998b).

Embora as técnicas de análise térmica não substituam completamente um programa clássico de estabilidade que implica longos tempos de observação, elas alertam para problemas potenciais e indicam direções para obtenção de formulações seguras e eficazes (RODANTE; VECCHIO; TOMASSETTI, 2002). O estudo acelerado de decomposição em elevadas temperaturas fornece as constantes de velocidades de degradação e a E_a requerida para quebrar as ligações químicas.

A partir dos dados obtidos de concentração remanescente pelo tempo, ou massa remanescente pelo tempo, os parâmetros cinéticos são calculados utilizando diversos modelos matemáticos disponíveis na literatura.

Este capítulo objetivou determinar os parâmetros cinéticos de degradação da ALG utilizando diferentes metodologias. O estudo contou com a avaliação da cinética de degradação por termogravimetria (TGA), utilizando método isotérmico e não isotérmico. Para confirmação e complementação dos resultados obtidos por TGA, o fármaco foi exposto às temperaturas em estufa (semelhantes às utilizadas na TGA) e análise por cromatografia líquida acoplada ao detector PDA-UV (LC-UV). Os parâmetros cinéticos foram calculados utilizando os modelos de Arrhenius, Ozawa e Kissinger. A citotoxicidade do fármaco não degradado e do fármaco degradado (170 °C/ 2h) também foi avaliada.

6.2 Materiais e Métodos

6.2.1 Cinética de degradação isotérmica e não isotérmica por termogravimetria

Os experimentos de TGA foram realizados em uma termobalança Shimadzu TGA-50 usando cadinhos de platina contendo aproximadamente 4 mg de amostra, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL/min). O equipamento foi previamente calibrado com oxalato de cálcio. A ALG foi previamente aquecida a 110 °C e então resfriada para remover a umidade.

6.2.1.1 Isotérmica

O estudo isotérmico foi realizado submetendo a amostra às temperaturas isotérmicas de 150, 155, 160, 165, 170 °C. A amostra foi mantida nestas temperaturas até que houvesse uma perda de massa de 10%. A razão de aquecimento usada foi de 10 °C/min. Os dados foram analisados aplicando análise de regressão linear e as equações de Arrhenius.

6.2.1.2 Não isotérmica

Nos experimentos dinâmicos, não isotérmicos, variaram-se as razões de aquecimento, utilizando 2,5, 5,0, 10,0 e 15 °C/min até alcançar a temperatura de 500 °C. Os dados foram analisados utilizando o método de Ozawa e o método de Kissinger. Os parâmetros cinéticos a partir do método de Ozawa foram obtidos automaticamente pelo software Shimadzu TGA-50, e foram também calculados manualmente.

6.2.2 Degradação em estufa e análise por LC-UV

Neste ensaio, o fármaco ALG disposto em béquer foi submetido às temperaturas de 130, 140, 150, 155, 160, e 170 °C em estufas (Biopar). Em tempos pré-determinados, alíquotas foram retiradas e analisadas por LC-UV. As determinações foram realizadas em triplicata. Os dados de teor (%) *versus* o tempo (h) foram plotados para determinar a ordem da reação. Os gráficos de ordem zero, primeira ordem e segunda ordem foram obtidos plotando a concentração *versus* tempo, o logaritmo da concentração pelo tempo e 1/concentração *versus* tempo, respectivamente. Após a determinação da ordem da reação, foram calculadas as constantes de velocidade de degradação para cada temperatura. O método gráfico de Arrhenius (logaritmo natural de K *versus* o inverso da temperatura em Kelvin) foi utilizado para o cálculo da constante de velocidade a 25 °C, a E_a , e o fator de frequência de Arrhenius.

6.2.2.1 Condições cromatográficas

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido Flexar Perkin Elmer, contendo bomba binária, autoamostrador e detector PDA no comprimento de onda 275 nm. A fase móvel utilizada foi uma mistura de tampão acetato de amônio 10 mM pH 3,5 e acetonitrila (10:90), fluxo de fase móvel 0,8 mL/min e coluna Nano Separation Technologies (NST) C₈ (250 x 4,6 mm, 5 µm). Os dados foram integrados pelo Software Chromera Workstation Perkin Elmer.

6.2.3 Citotoxicidade do fármaco não degradado e degradado

Para este ensaio foram utilizadas duas soluções, uma não degradada e uma degradada a 170 °C/ 2h. Ambas foram preparadas na concentração de 10 mg/mL em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI), e filtradas em membrana de 0,22 µm antes do ensaio.

As células utilizadas foram da linhagem CRIB (Cell Resistant to Infection by BVDV, derivada da MDBK - *Madin-Darby bovine kidney*) (ATCC CCL22) cultivadas e mantidas em meio essencial mínimo (MEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino e 1,25 mg/mL de gentamicina. Os cultivos foram realizados em garrafas estéreis com área de cultivo de aproximadamente 25 cm², incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% CO₂ (Minitub, Porto Alegre, RS, Brazil). As células foram repicadas a cada 3 dias utilizando 1 mL de tripsina (2,5 mg/mL) em capela de fluxo laminar (TROX, Modelo FLV).

O teste MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) foi utilizado para investigar a citotoxicidade do fármaco degradado e não degradado (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991). Após a formação do tapete celular as células foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 4,5 x 10⁵ células/ml em meio RPMI contendo soro e antibióticos. Aliquotas de 100 µL (4,5 x 10⁴ células) foram dispensadas em cada cavidade de placas de 96 cavidades e incubadas conforme descrito acima. Após a confluência do tapete celular (24h) o meio foi removido e adicionou-se o fármaco não degradado e degradado diluído nas

concentrações de 5,0 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, 0,312 mg/mL, 0,156 mg/mL, 0,078 mg/mL e 0 mg/mL em meio RPMI contendo apenas antibióticos, em quintuplicata sendo mantido um controle negativo (células nas mesmas condições, sem o fármaco). As placas foram incubadas por 96 h. Em seguida, descartou-se o sobrenadante de cada cavidade e adicionou-se 50 µL de MTT (1 mg/mL em RPMI) e incubou-se a 37°C em estufa de CO₂ a 5% por 4 horas. Após, o sobrenadante (50 µL) foi removido e foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por cavidade, agitaram-se as placas por 5-10 minutos e estas foram incubadas por mais 15 minutos. Posteriormente, as placas foram lidas e as absorvâncias (em densidade óptica – OD) foram medidas em comprimento de onda de 550 nm em um leitor de ELISA (Anthos 2010). Para a avaliação da viabilidade celular, o percentual de células viáveis foi calculado utilizando a equação 5:

Equação 5:

$$viabilidade\ celular\ (\%) = \frac{DO_{células\ tratadas} \times 100}{DO_{células\ controle}}$$

Onde DO é a densidade óptica. As células controle foram consideradas 100% viáveis. Os valores de DO foram convertidos em percentuais e plotados frente às diferentes concentrações dos fármacos visando a determinar a concentração citotóxica para 50% do cultivo celular (CC50%).

6.3 Resultados e Discussão

Diferentes métodos podem ser utilizados quando se quer obter os parâmetros cinéticos envolvidos em uma reação de degradação. Os parâmetros cinéticos podem ser obtidos, a partir da TGA e da degradação das amostras em estufa e análise por LC. Para determinação dos parâmetros, existem diferentes modelos matemáticos que são aplicados, sendo que a grande maioria se baseia em modificações do método de Arrhenius.

Esses dados são importantes para conhecermos o processo envolvido em uma reação de degradação, porém, quando se quer determinar o prazo de validade, ocorre

uma distorção acentuada do resultado, devido ao fato de usarmos altas temperaturas e o fármaco estar no estado sólido, onde a velocidade de colisão entre as moléculas é menor do que em um líquido. Idealmente, o prazo de validade deve ser determinado em condições normais de armazenagem, sem o envolvimento de extrapolações, pois reações que ocorrem em altas temperaturas dificilmente ocorrem em temperaturas mais amenas (HUYNH-BA, 2009).

6.3.1 Cinética termogravimétrica isotérmica

Nas condições de cinética isotérmica (figura 6.1) pode-se observar que a perda de massa é dependente da temperatura. Quanto maior a temperatura, menor o tempo necessário para ocorrer a mesma perda de massa. Na figura 6.1 está indicado o tempo necessário para perder 10% de massa em cada uma das temperaturas utilizadas.

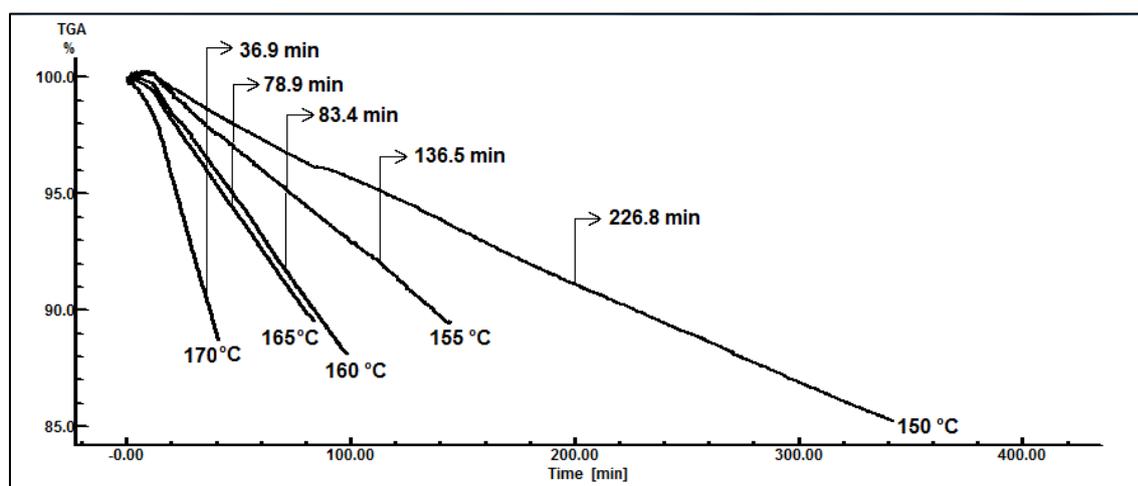


Figura 6.1 Curvas termogravimétricas isotérmicas da ALG obtidas em 150, 155, 160, 165 e 170 °C sob atmosfera de nitrogênio.

Para determinar a ordem da reação foram plotados os gráficos de massa remanescente (%) *versus* tempo (min), o logaritmo da massa remanescente *versus* tempo (min), e 1/ massa remanescente *versus* tempo (min) (FLORENCE; ATTWOOD, 2011). Para isso, fixou-se o percentual de perda de massa em 98, 96, 94, 92 e 90 % e obteve-se o tempo (min) em que estes percentuais foram atingidos.

A partir dos gráficos, a velocidade de degradação seguiu uma cinética de zero ordem para as três primeiras temperaturas estudadas (150, 155 e 160 °C), e nas outras duas, seguiu cinética de primeira e segunda ordem (tabela 6.1). Porém os valores do coeficiente de correlação ficaram muito semelhantes entre si. Este fato está relacionado ao baixo percentual de perda de massa obtido (cerca de 10%). Para uma determinação correta e adequada da ordem da reação, necessita-se degradar cerca de 50% da massa (FLORENCE; ATTWOOD, 2011). Contudo, estes resultados já indicam uma grande estabilidade térmica do fármaco, o que é positivo do ponto de vista comercial.

Tabela 6.1 Valores dos coeficientes de correlação obtidos, plotando-se os gráficos de zero (massa (%) x tempo (h)), primeira (logaritmo da massa (%) x tempo (h)), e segunda (1/massa (%) x tempo (h)) ordem em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	R zero ordem	R primeira ordem	R segunda ordem
150	-0,9998	-0,9997	-0,9995
155	-0,9997	-0,9994	-0,9989
160	-0,9999	-0,9998	-0,9992
165	-0,99985	-0,99999	-0,99996
170	-0,9992	-0,9994	-0,9994

Apesar dos coeficientes de correlação terem ficado próximos para os três modelos avaliados, provavelmente devido ao baixo percentual de degradação, os parâmetros foram calculados de acordo com uma cinética de zero ordem, pois 3 das temperaturas estudadas seguiram essa cinética e, posteriormente, a ordem da reação foi confirmada nos estudos em estufa.

A velocidade de degradação (K_0) em cada temperatura foi calculada a partir da equação de zero ordem, onde a decomposição ocorre em uma velocidade constante, independente da concentração dos reagentes (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

$$dC/dt = K_0$$

Integrando, e considerando $x = 0$ e $t = 0$, tem-se:

Equação 6:

$$\int_0^c dc = K_0 \int_0^t dt$$

Ou seja:

$$C = C_0 - k_0.t$$

Isolando K_0 , têm-se:

Equação 7:

$$K_0 = \frac{C_0 - C}{t}$$

Onde K_0 representa a velocidade de degradação de ordem zero, C_0 é a concentração inicial, e C é a concentração medida no tempo t .

A partir da equação 4 de Arrhenius, a E_a é calculada (equação 8):

Equação 8:

$$\text{inclinação} = - \frac{E_a}{R}$$

Sendo R a constante dos gases perfeitos (1,987 cal/ mol). O A foi obtido a partir da equação 9:

Equação 9:

$$\text{intercepto} = \ln A$$

A constante de velocidade de degradação (K_0) foi calculada para cada temperatura (equação 7), e posteriormente foi plotado o gráfico de Arrhenius ($\ln K$ versus $1/T$ em kelvin) (figura 6.2). A partir da equação da reta, foi obtida a E_a (equação 8), a constante de velocidade de degradação à 25°C (K_{25}), e o fator de frequência de Arrhenius (A) (equação 9). Os valores obtidos foram: $E_a = 31.038,64$ cal/mol, $K_{25} = 8,45 \cdot 10^{-9}$ /min, e $A = 4,94 \cdot 10^{14}$ /min.

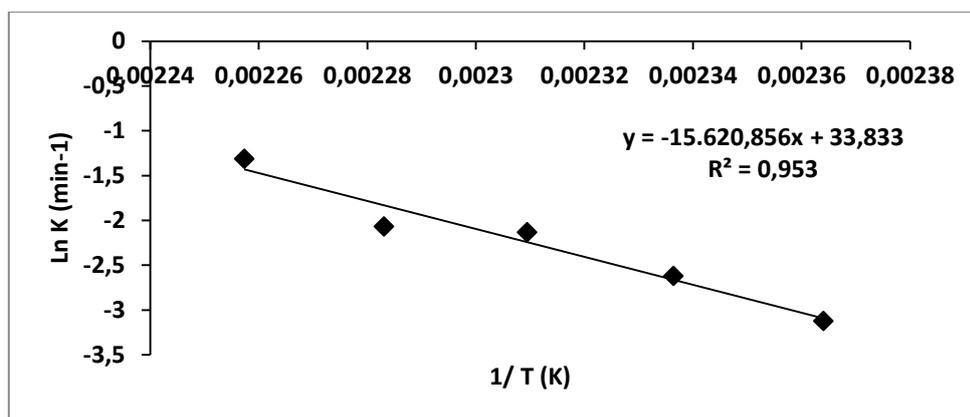


Figura 6.2 Gráfico do logaritmo natural das constantes de velocidades de degradação em cada temperatura *versus* 1/temperatura (em °Kelvin) obtidos pelo método termogravimétrico isotérmico.

Na literatura, alguns trabalhos calculam a E_a a partir do gráfico do logaritmo natural do tempo *versus* $1/T$ (K), sem determinar a ordem da reação, utilizando o tempo necessário para perder 5, 8 ou 10% de massa, pois este tempo poderia estar relacionado ao prazo de validade (BERTOL et al., 2010; FELIX et al., 2009; MURAKAMI et al., 2009). Ao plotar este gráfico (\ln tempo x $1/T$) e obter um coeficiente de correlação próximo a 1, indica que a ordem da reação permanece constante e é de zero ordem (GOMES; SOUZA; MACÊDO, 2003; MURAKAMI et al., 2009). A E_a é obtida utilizando a equação 8.

Neste estudo, este gráfico de $\ln t$ *versus* $1/T$ também foi plotado, utilizando o tempo necessário para perder 10% de massa (figura 6.3). A E_a calculada foi de 32.139,7 cal/mol. O valor de A mostrou-se muito distinto do obtido acima.

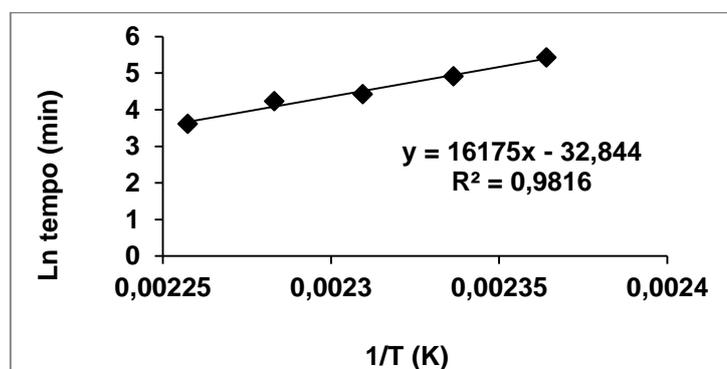


Figura 6.3 Gráfico do logaritmo natural do tempo para perder 10% de massa *versus* o inverso da temperatura (°K) obtidos a partir dos dados de curvas isotérmicas termogravimétricas.

6.3.2 Cinética termogravimétrica não isotérmica

Os dados termogravimétricos não isotérmicos obtidos utilizando diferentes razões de aquecimento estão descritos na tabela 6.2. Os gráficos de perda de massa (%) versus temperatura das curvas TGA em diferentes razões de aquecimento foram plotados. Os resultados demonstram que as curvas TGA foram deslocadas para maiores temperaturas quando aumentamos as razões de aquecimento (figura 6.4c).

Ozawa (1965) propôs um método para análise de dados termogravimétricos, com ênfase na análise de polímeros de alto peso molecular, baseado na equação de Arrhenius, e este método está disponível para análise de dados TGA no software TG-50 (Shimadzu). Este método propõe obter a energia de ativação pela linearização da razão de aquecimento (β) (método de isoconversão), empregando análise térmica e a equação de Arrhenius, pois há uma relação linear entre $\log \beta$ versus $1/T$ (FELIX et al., 2009). O gráfico de Ozawa, obtido através do TGA-50 (figura 6.4b) mostrou uma boa correlação entre as 4 curvas, considerando a primeira etapa de decomposição das curvas. Este método foi aplicado nas curvas TGA para determinar a E_a e o fator de frequência de Arrhenius (A). Estes parâmetros foram calculados para a primeira fase de decomposição térmica (entre 185 a 285 °C). Os parâmetros cinéticos obtidos pelo TGA-50 foram: $E_a = 109,61$ KJ/mol (26.197,42 cal/mol), e $A = 3,358 \times 10^{10}$ /min. Outros autores também utilizaram este software para o cálculo dos parâmetros cinéticos de degradação pelo método não isotérmico (CIDES et al., 2006; FELIX et al., 2009; SILVA et al., 2007).

O gráfico de Ozawa foi obtido também plotando o $\ln \beta$ (razão de aquecimento) em função do inverso da temperatura de pico ($1/T_m$) (figura 6.4a) (TIȚA et al., 2010). O T_m é a temperatura (em °K) de pico da primeira fase de decomposição, obtida a partir das curvas da primeira derivada das curvas TGA (DTGA). Os picos DTGA de degradação foram 201,11 °C, 208,38 °C, 213,58 °C e 219,82 °C para as razões de aquecimento de 2,5, 5,0, 10,0 e 15,0 °C/min, respectivamente. A E_a foi obtida a partir da inclinação da equação 8, do gráfico de $\ln \beta$ versus $1/T_m$, obtendo-se um valor de 191,94 KJ/mol (45.874,76 cal/mol) e o A obtido a partir do intercepto da curva foi de $4,69 \cdot 10^{21}$ /min.

Tabela 6.2 Características do comportamento térmico da primeira fase de degradação da ALG no método termogravimétrico não isotérmico.

β ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	T_i ($^{\circ}\text{C}$)	T_f ($^{\circ}\text{C}$)	T_m (DTA) ($^{\circ}\text{C}$)	T_m (DTA) (K)	Δm (%)
2,5	183,46	255,02	201,11	474,26	22,26
5,0	200,64	265,52	208,38	481,53	18,71
10,0	203,26	269,57	213,58	486,73	15,21
15,0	205,17	276,01	219,82	492,97	16,26

β ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$) = razão de aquecimento, T_i = temperatura inicial de degradação, T_f = temperatura final de degradação, T_m = temperatura do pico de degradação obtida a partir da derivada da TGA (DTGA) e Δm = perda de massa.

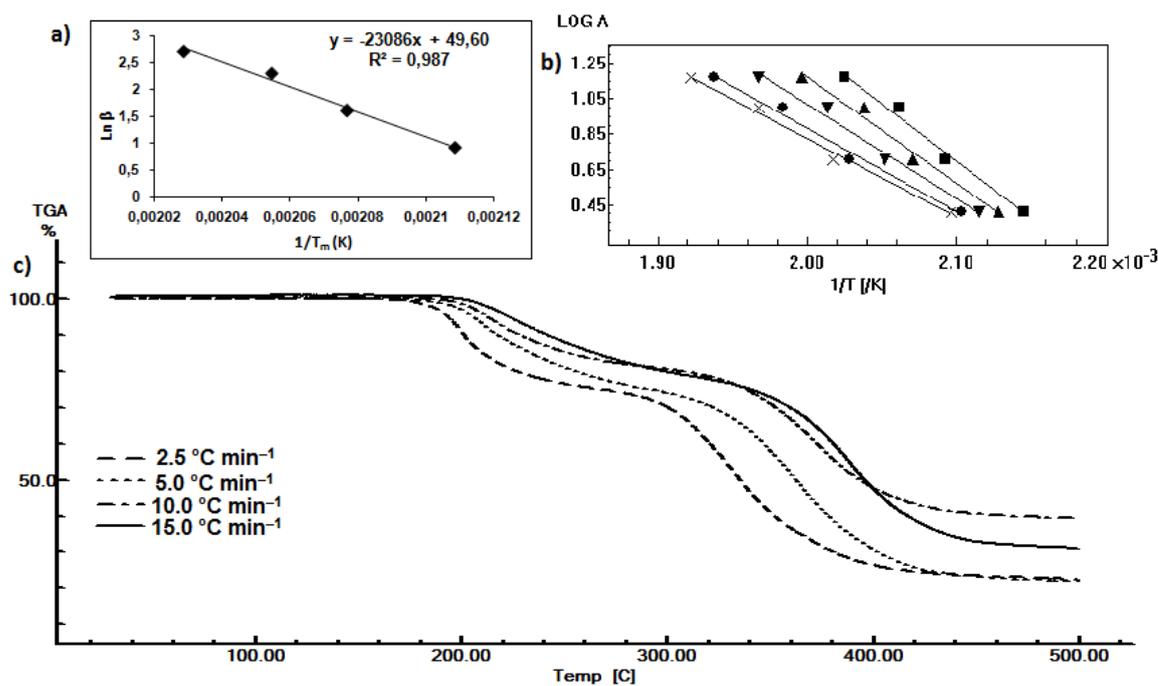


Figura 6.4 Curvas TGA não isotérmicas obtidas utilizando diferentes razões de aquecimento, mostrando a perda de massa (%) vs. temperatura (c), o gráfico de Ozawa (obtido com o software TGA-5) (b) e o gráfico de Ozawa correlacionando a razão de aquecimento (β) e a temperatura do pico da primeira etapa de decomposição, obtida pela DTGA (a) da ALG.

A E_a foi também calculada após obter o gráfico de Kissinger (CAMPANELLA et al., 2011; KISSINGER, 1957), onde foi plotado $\ln \text{LN} (\beta / T_m^2)$ versus $(1/T_m)$ (figura 6.5). A E_a e o A foram calculados a partir da equação 10:

Equação 10:

$$\ln \left(\frac{\beta}{T_m^2} \right) = a - b \left(\frac{1}{T_m} \right)$$

A E_a foi calculada a partir da equação 8, obtendo-se um valor de 183,89 KJ/mol (43.950,76 cal/mol). O fator de frequência de Arrhenius foi calculado a partir do intercepto (equação 11), obtendo $4,46 \cdot 10^{19}$ /min.

Equação 11:

$$\text{intercepto } (a) = \ln \left(\frac{A \cdot R}{E_a} \right)$$

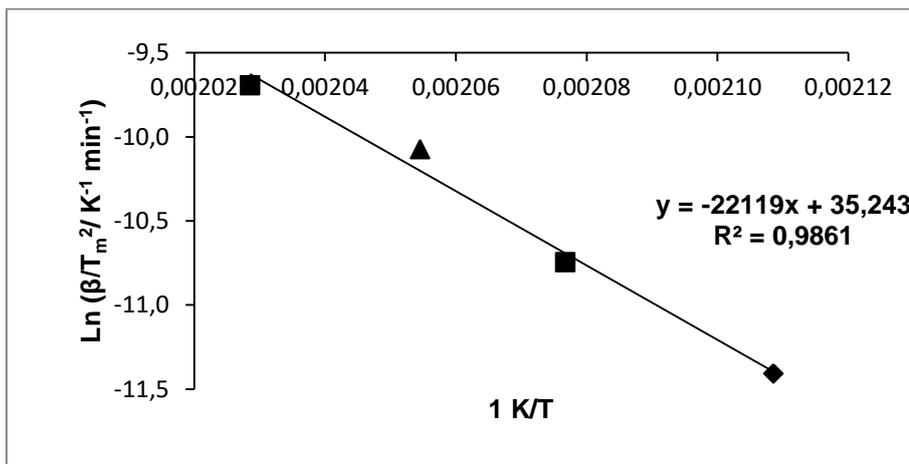


Figura 6.5 Gráfico de Kissinger para o primeiro passo de decomposição da ALG, obtido a partir dos dados TGA não isotérmicos.

6.3.3 Degradação em estufa e análise por LC-UV

O estudo de degradação estufa e análise por LC foi realizado para complementar os resultados obtidos na TGA, e verificar se há uma correlação. Na

TGA foi avaliada a perda de massa, enquanto na LC foi avaliada a perda de teor químico.

Os percentuais de degradação obtidos foram maiores que 50% em todas as temperaturas (figuras 6.6 e 6.7). Os gráficos de zero, primeira e segunda ordem foram plotados, e os valores de coeficiente de correlação (R) foram determinados (tabela 6.3). Os valores de R mais próximos a 1, definiram a ordem da reação como sendo de zero ordem, assim como na análise TGA isotérmica. Muitas reações de decomposição de sólidos ou em suspensões seguem cinética de ordem zero (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

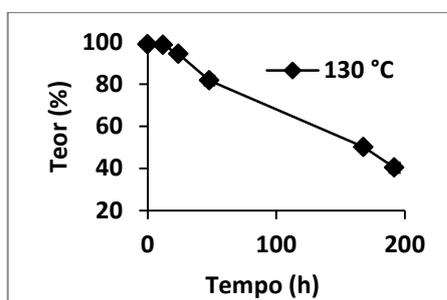


Figura 6.6 Teor (%) remanescente da ALG submetida à temperatura de 130 °C.

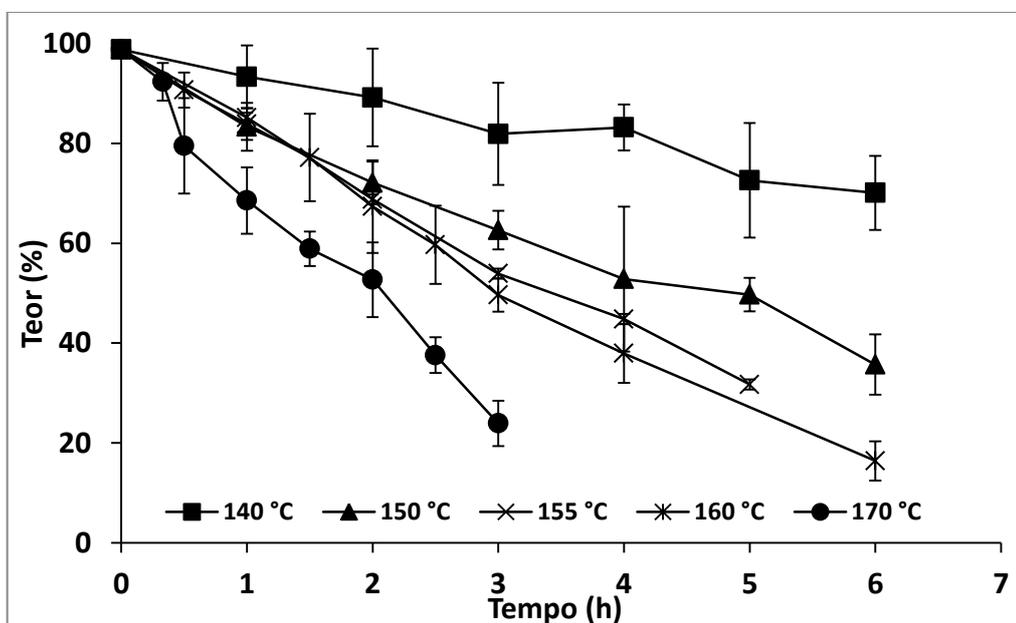


Figura 6.7 Teor (%) remanescente da ALG submetida às temperaturas de 140, 150, 155, 160 e 170 °C.

Tabela 6.3 Valores dos coeficientes de correlação obtidos, plotando-se os gráficos de zero (concentração (%) x tempo (h)), primeira (logaritmo da concentração (%) x tempo (h)), e segunda (1/concentração (%) x tempo (h)) ordem em diferentes temperaturas.

Temperatura (°C)	R zero ordem	R primeira ordem	R segunda ordem
130	-0,9963	-0,9947	-0,9847
140	-0,9816	-0,9788	-0,9738
150	-0,9895	-0,9888	-0,9597
155	-0,9968	-0,9931	-0,9612
160	-0,9946	-0,9841	-0,9120
170	-0,9914	-0,9750	-0,9128

A partir dos valores de K_0 obtidos para cada temperatura (equação 7), utilizou-se o método gráfico de Arrhenius para o cálculo da E_a e do K a 25 °C. Para isso, plotou-se o gráfico do logaritmo natural da constante de velocidade de degradação ($\ln K$) versus o inverso da temperatura ($1/T$ Kelvin) (figura 6.8).

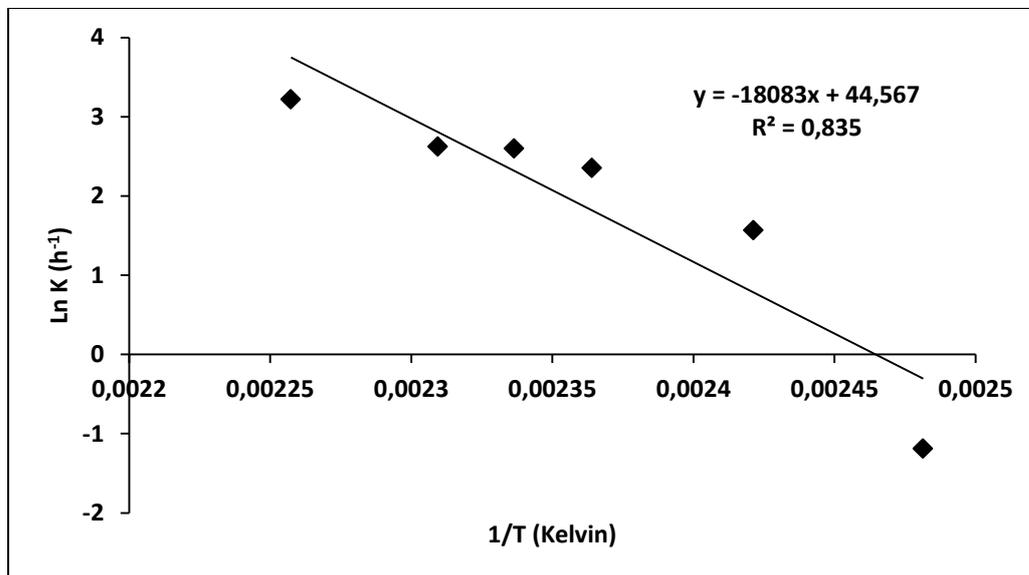


Figura 6.8 Gráfico do logaritmo natural das constantes de velocidade de degradação em cada temperatura *versus* o inverso da temperatura em °Kelvin obtidos pelo método de degradação em estufa e análise por LC-UV.

A partir da equação da reta, calculou-se o K a 25 °C (K_{25}), substituindo na equação o “x” por 1/298. O valor do K_{25} foi de $1,004 \cdot 10^{-7} \text{ h}^{-1}$.

A E_a e o A foram calculados (equação 8 e 9), obtendo o valor de -35930,18 cal/mol e $2,26 \cdot 10^{19} \text{ h}^{-1}$, respectivamente.

O prazo de validade também foi determinado, porém os valores obtidos não conferem com a realidade (dados não apresentados). Isso pode estar relacionado a diversos fatores, como por exemplo, o estudo foi realizado em altas temperaturas, e muitas vezes quando se trabalha com altas temperaturas, pode haver a formação de sistemas heterogêneos. Sistemas heterogêneos são observados quando a matéria-prima está em mais de um estado de cristalinidade, com diferentes reatividades. Se o grau de alteração da matéria-prima muda conforme a temperatura aumenta, existe a possibilidade de que a contribuição relativa de cada forma cristalina seja alterada. Em sistemas heterogêneos deve ser utilizado um método de isoconversão, onde o produto de degradação que é formado deve ser conhecido e monitorado. Além disso, idealmente, o percentual deste produto deve ser mantido baixo durante o estudo, em diversas temperaturas e, para isso ocorrer, temperaturas mais amenas devem ser utilizadas. Como no gráfico de Arrhenius é utilizado o logaritmo da constante da velocidade, pequenos erros na extrapolação podem levar a erros significativos no prazo de validade (HUYNH-BA, 2009).

Neste estudo, foi observada a formação de um produto de degradação nos cromatogramas em todas as temperaturas utilizadas (TR de cerca 7,5 min) (chamado de pico 2), após a eluição do fármaco (TR = 7,0 min) (figura 6.9). Outro pico surgiu antes da eluição do fármaco (TR de cerca de 3,0 min) (chamado de pico 1). Entretanto a análise da pureza pelo detector PDA, mostrou pureza maior que 1,5 (conforme o software Chromera Flexar Perkin Elmer), ou seja, há mais de uma substância eluindo no mesmo tempo de retenção, sendo assim, este primeiro pico não foi monitorado, já que se trata de mais de uma substância. O pico após a eluição do fármaco apresentou pureza compatível com uma única substância, porém, o percentual de formação deste produto de degradação não ocorreu de forma linear, ou seja, conforme houve o decréscimo do teor do fármaco, não foi observada a formação do produto de degradação na mesma proporção, sendo difícil monitorar apenas a formação do

produto de degradação para o cálculo dos parâmetros cinéticos. Conforme Lu e colaboradores (2016), após hidrólise térmica, ocorre a perda do grupo amina do anel piperidina da ALG e deslocamento do nitrogênio no anel, formando um produto de polaridade semelhante à ALG, com tempo de retenção semelhante ao fármaco. Neste estudo, este produto de degradação (pico 2) não foi identificado, porém, pode-se sugerir que foi formado um produto de polaridade semelhante a ALG, ou seja semelhante à substância relacionada (RS) 3 descrita pelos autores (tabela 3.3, pg. 38).

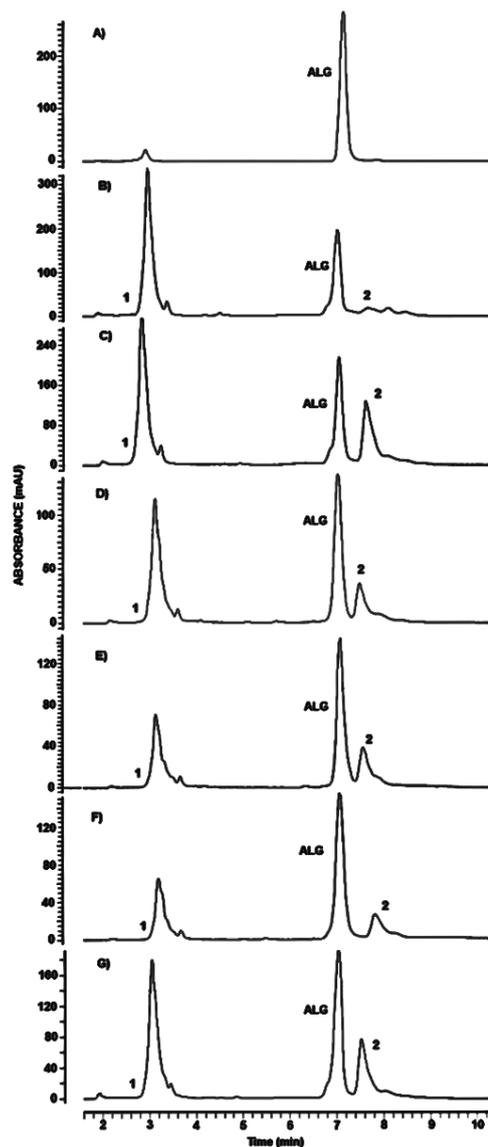


Figura 6.9 Cromatogramas A) ALG sem degradação, ALG exposta a: B) 130 °C por 168 h (teor remanescente de cerca de 50%), C) 140 °C por 5 h (teor remanescente de cerca de 70%), D) 150 °C por 5 h (teor remanescente de cerca de 50%), E) 155 °C por 4 h (teor remanescente de cerca de 45%), F) 160 °C por 2,5 h (teor remanescente de cerca de 60%), G) 170 °C por 2 h teor remanescente de cerca de 50%). Pico 1 é o pico de degradação 1, e pico 2 é o pico de degradação 2.

O logaritmo natural das constantes de velocidades obtidas nas temperaturas de 150, 155, 160 e 165 °C pelo método em estufa (ln K do teor) e pelo método termogravimétrico isotérmico (ln K da massa) foram comparadas, e foi observada uma correlação positiva, conforme figura 6.10. O valor do coeficiente de determinação (R^2) demonstra uma correlação de 92 % ($0,9225 \times 100$) entre a resposta da variável x em relação à variável y.

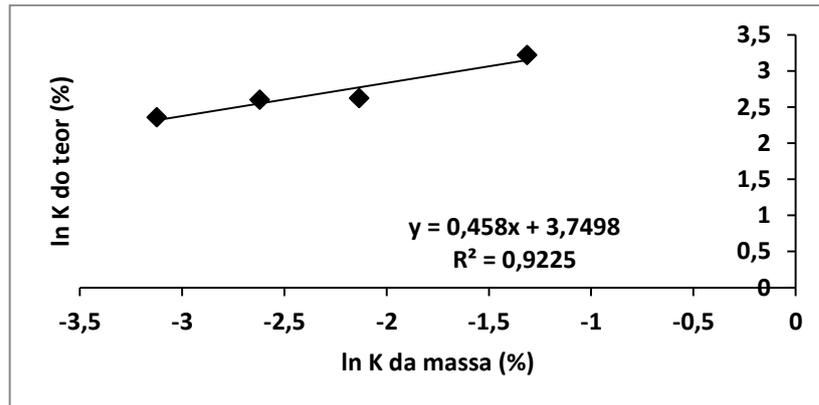


Figura 6.10 Comparação do logaritmo natural das constantes de velocidades obtidas nas temperaturas de 150, 155, 160 e 165 °C pelo método em estufa e pelo método termogravimétrico isotérmico.

Os parâmetros cinéticos obtidos a partir de diferentes metodologias estão compilados na tabela 6.4.

Tabela 6.4 Compilação dos parâmetros cinéticos da degradação da ALG obtidos por diferentes métodos.

Método		Parâmetros cinéticos				
		Ordem da reação	Energia de Ativação (cal/mol)	Fator de Frequência de Arrhenius (A)	K25	
Degradação em estufa – análise por LC-UV		Arrhenius	0	35.930,18	$2,26 \cdot 10^{19} \text{ h}^{-1}$	$11,004 \cdot 10^{-7} \text{ h}^{-1}$
Termogravimetria	Isotérmico	Arrhenius	0	31.038,64	$4,94 \cdot 10^{14} \text{ min}^{-1}$	$8,45 \cdot 10^{-9} \text{ min}^{-1}$
		Arrhenius Ln t x 1/T (K)	ND	32.139,7	ND	ND
Não Isotérmico		Ozawa software	5	26.197,42	$3,358 \times 10^{10} \text{ min}^{-1}$	ND
		Ozawa calculado	ND	45.874,76	$4,69 \cdot 10^{21} \text{ min}^{-1}$	ND
		Kissinger	ND	43.950,76	$4,46 \cdot 10^{19} \text{ min}^{-1}$	ND

ND = não determinado.

Diferentes metodologias foram utilizadas para confirmar a elevada estabilidade do fármaco. É possível observar diferenças nos resultados obtidos a partir de diferentes metodologias. A E_a foi semelhante quando comparamos o método em estufa com o método TGA isotérmico, onde para ambos, a E_a foi calculada a partir do método de Arrhenius. Porém o A e o K_{25} foram distintos, quando estes dois métodos são comparados. No método TGA não isotérmico, alguns parâmetros não foram determinados, sendo que os resultados da E_a obtida pelos métodos de Ozawa (calculado) e Kissinger foram semelhantes entre si, porém diferentes dos obtidos pelas outras metodologias e, além disso, apresentando valores mais elevados. Quanto maior a energia de ativação, maior é a estabilidade do fármaco, pois a E_a representa a energia necessária para que a reação de degradação ocorra.

Poucos trabalhos avaliam detalhadamente a cinética de decomposição de preparações sólidas. Muitos trabalhos foram desenvolvidos com o objetivo de prever a estabilidade, utilizando equações de velocidade derivadas de reações em solução. As equações de Arrhenius foram inicialmente desenvolvidas para formulações líquidas e adaptadas para sólidos (FLORENCE; ATTWOOD, 2011).

A grande maioria dos trabalhos que avaliam a cinética de sólidos utiliza a TGA como método de análise, devido à facilidade e rapidez para obtenção dos dados. O método não isotérmico é ainda mais rápido que o método isotérmico. Além disso, os equipamentos apresentam softwares que auxiliam na análise dos parâmetros cinéticos, como neste estudo, onde foi utilizado o TGA-50 da Shimadzu no estudo não isotérmico. A crítica relacionada ao uso do software é que para obtenção dos parâmetros o próprio usuário seleciona a parte da curva que quer que seja feita a análise e, dependendo da parte selecionada, diferentes resultados são obtidos. O método isotérmico, apesar de demorar mais que o não isotérmico, fornece resultados mais seguros. Muitos trabalhos descritos na literatura utilizando o método isotérmico calculam os parâmetros utilizando perda de massa de até 10%, entretanto, o ideal é que haja uma perda de massa maior que 10%.

A utilização do método de Arrhenius para estimar o tempo de estocagem tem uma limitação, se, por exemplo, degradação inferior a 10% for alcançada, a distinção

entre as cinéticas de zero, primeira e segunda ordem ficará prejudicada. (FLORENCE; ATWOOD, 2011).

Alguns trabalhos comparam os resultados TGA obtidos pelos métodos isotérmico e não isotérmico, e consideram adequados quando há concordância (BERTOL et al., 2010; MURAKAMI et al., 2009). Em contrapartida, outros autores descrevem que métodos isotérmicos e não isotérmicos não devem ser comparados diretamente, pois eles são realizados em faixas de temperatura diferentes. Conforme esses autores, o método não isotérmico é mais realista, reflete mais a cinética em múltiplos passos, pois usa ampla faixa de temperatura (RODANTE; VECCHIO; TOMASSETTI, 2002). A escolha da faixa de temperatura também depende do analista, então nem sempre se seleciona uma ampla faixa de temperatura, costuma-se usar a primeira etapa de degradação (FELIX et al., 2009; TIȚA et al., 2010).

Outro problema relacionado a cinética TGA de degradação de sólidos é que diversos trabalhos descrevem a E_a e não descrevem o prazo de validade (BERTOL et al., 2010; BURNHAM; DOLLIMORE; ALEXANDER, 2002; MEDEIROS et al., 2001; MURAKAMI et al., 2009; TITA et al., 2009). Isso pode estar relacionado ao fato de serem obtidos valores exorbitantes para o $t_{10\%}$, pela escolha do modelo matemático incorreto, por se tratar de um sistema heterogêneo, porque o que ocorre em altas temperaturas não condiz ou não poderia ser extrapolado para a temperatura ambiente. Em poucos trabalhos encontra-se o prazo de validade calculado e com resultados coerentes (CAMPANELLA et al., 2011; RODANTE; VECCHIO; TOMASSETTI, 2002).

Rodante, Vecchio e Tomasseti (2002) estudaram a decomposição térmica de sais de penicilina usando método isotérmico e não isotérmico (livre de modelo “*model free*”, sem assumir uma determinada ordem de reação para calcular os parâmetros) e método isotérmico utilizando modelos de ajuste (“*model-fitting*”) e obtiveram valores muito discrepantes na determinação do prazo de validade, que variaram de 0,05 a mais de 3.000 anos. Os autores concluem que o método não isotérmico “*model-free*” mostrou-se mais apropriado, pois reflete a complexidade da reação devido à ampla faixa de temperatura usada (RODANTE; VECCHIO; TOMASSETTI, 2002).

Essa complexidade foi também observada na decomposição do captopril, onde se notou que no primeiro evento de decomposição o fármaco segue cinética de segunda ordem e para o segundo evento de decomposição segue cinética de primeira ordem (HUANG et al., 2001).

Ademais, neste estudo foi avaliada apenas a temperatura como fator de degradação, contudo outros fatores podem levar à degradação de fármacos, como luz, oxidação e umidade. Grupos químicos como éster, amida, lactona, lactama e imida podem ser susceptíveis à degradação hidrolítica. Na oxidação, a luz, calor ou resíduos de metais iniciam a formação de radicais livres onde alcenos, aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos carboxílicos são susceptíveis a oxidação. As reações de fotodecomposição podem ocorrer com diversos grupos químicos, porém grupos como carbonil, nitroaromáticos, N-óxidos, aril haletos, alcenos, polienos e sulfetos induzem essas reações (FLORENCE; ATWOOD, 2011).

Na ALG o anel pirimidina está presente (figura 6.11 anel 2) e o nitrogênio está ligado a duas carbonilas, que poderia ser susceptível a reação de hidrólise pela presença da umidade. As ligações duplas (alcenos) presentes na molécula podem ser susceptíveis a reações de oxidação e fotodecomposição.

Em solução, a ALG sofre reações de hidrólise e oxidação, porém não sofre fotodecomposição. Conforme Lu e colaboradores (2016), após reação de oxidação, houve a introdução de uma hidroxila no anel pirimidina (figura 6.11 anel 2), após hidrólise ácida, perdeu-se o anel piperidina (figura 6.11 anel 1), após hidrólise básica, perderam-se os anéis pirimidina e piperidina (figura 6.11 anéis 1 e 2), após hidrólise básica e oxidação, o grupo nitrila do anel benzênico é perdido e ocorre a inserção de uma amida (figura 6.11 anel 3) e após degradação térmica ocorre a perda da amina da piperidina (figura 6.11 anel 1). Zhou e colaboradores (2014) descrevem a mesma impureza que Lu e colaboradores (2016) após hidrólise ácida. Zhou e colaboradores (2014) e Zhang e colaboradores, (2015) descrevem a perda do grupo nitrila e inserção da amida, uma reação que ocorre após hidrólise, enquanto Lu e colaboradores (2016) descrevem a formação dessa impureza após hidrólise básica e oxidação.

Contudo, essas reações ocorrem em meio líquido e não podem ser diretamente comparadas às reações em meio sólido.

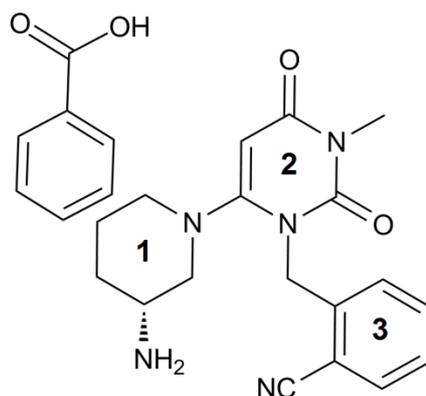


Figura 6.11 Estrutura química do benzoato de alogliptina, indicando a piperidina no anel 1, a pirimidina no anel 2 e a benzonitrila no anel 3.

6.3.4 Citotoxicidade do produto de degradação em células CRIB

Os resultados obtidos em relação à viabilidade celular mostram que o fármaco degradado foi menos tóxico que o fármaco não degradado (figura 6.12). A degradação ocorreu a 170 °C por 2h, onde se tem uma perda de 50% do fármaco e formação de cerca de 15% de produto de degradação. Para a ALG não degradada a CC 50% foi de 1354,6 µg/mL e para a degradada foi necessária concentração de 2147,46 µg/mL para inviabilizar 50% do cultivo celular.

Na literatura, são encontrados trabalhos em que foi avaliada a toxicidade do produto de degradação de outros fármacos. O meropenem degradado (no estado sólido, em solução neutra e alcalina) mostrou maior toxicidade *in vitro* que o meropenem não degradado em células mononucleares humana (MENDEZ et al., 2008). Já para a oxaliplatina, o produto de degradação apresentou toxicidade semelhante ao fármaco em uma linhagem celular de adenocarcinoma humano (JERREMALM et al., 2004).

A determinação da citotoxicidade é importante para avaliar a segurança biológica das impurezas, incluindo produtos de degradação (ICH,2006).

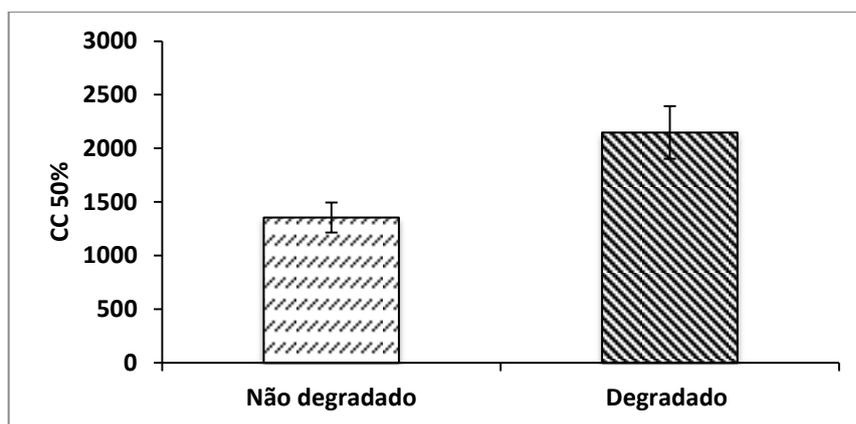


Figura 6.12 Concentração citotóxica para 50% do cultivo celular (CC50%) da ALG não degradada e degradada.

6.4 Conclusão

A ALG segue degradação de zero ordem, onde a velocidade de degradação independe da concentração do reagente e é constante. Os métodos TGA e LC-UV se correlacionaram, ou seja, neste caso a constante de velocidade de degradação de perda de massa está relacionada à constante de velocidade de degradação de perda química.

Os parâmetros cinéticos variaram de acordo com o método utilizado e o modelo matemático aplicado. A E_a variou de 26 kcal/mol a 45 kcal/mol. O prazo de validade mostrou-se discrepante da realidade e isso está relacionado à complexidade das reações em estado sólido.

O método termogravimétrico fornece resultados mais rápidos, porém há dificuldades na interpretação dos resultados e imprecisão. Outros modelos matemáticos mais apropriados podem ser utilizados buscando melhor obtenção dos parâmetros cinéticos na extrapolação dos resultados para a temperatura ambiente.

O fármaco degradado demonstrou ser menos tóxico em ensaio de citotoxicidade em células CRIB.

REFERÊNCIAS

- ALSANTE, K. M.; ANDO, A.; BROWN, R.; ENSING, J.; HATAJIK, T. D.; KONG, W.; TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, n. 1, p. 29–37, 2007.
- BAJAJ, S.; SINGLA, D.; SAKHUJA, N. Stability Testing of Pharmaceutical Products. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 2012, p. 129–138, 2012.
- BALL, D. W. **Físico-química**. São Paulo: Thomson, 2006.
- BERTOL, C. D.; CRUZ, A. P.; STULZER, H. K.; MURAKAMI, F. S.; SILVA, M. A. S. Thermal decomposition kinetics and compatibility studies of primaquine under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 102, n. 1, p. 187–192, 2010.
- BLESSY, M.; PATEL, R. D.; PRAJAPATI, P. N.; AGRAWAL, Y. K. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 3, p. 159–165, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE N° 1, de 29 de julho de 2005. **Guia para a realização de estudos de estabilidade**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 08 junho 2016.
- BURNHAM, L.; DOLLIMORE, D.; ALEXANDER, K. S. Kinetic study of the drug acetazolamide using thermogravimetry. **Thermochimica Acta**, v. 392–393, n. 1–2, p. 127–133, 2002.
- CAMPANELLA, L.; MICIELI, V.; TOMASSETTI, M.; VECCHIO, S. Kinetic investigation and predictive model for the isothermal degradation time in two commercial acetylsalicylic acid-based pharmaceutical tablet formulations. **Thermochimica Acta**, v. 526, n. 1–2, p. 151–156, 2011.
- CIDES, L. C. S.; ARAÚJO, A. A. S.; SANTOS-FILHO, M.; MANTOS, J. R. Thermal behaviour, compatibility study and decomposition kinetics of glimepiride under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 84, n. 2, p. 441–445, 2006.
- CLANCY, D.; HODNETT, N.; ORR, R.; OWEN, M.; PETERSON, J. Kinetic Model Development for Accelerated Stability Studies. **AAPS PharmSciTech**, 2016.
- DUNCAN, M.; ZARETSKY, I. Pharmaceutical Formulation & Quality. **Pharmaceutical Formulation & Quality**, v. 13, n. 2, 2011.

FELIX, F. S.; da SILVA, L. C. C.; AGNES, L.; MATOS, J. R. Thermal behavior study and decomposition kinetics of salbutamol under isothermal and non-isothermal conditions. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 877–880, 2009.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. Tradução Zuleika Rothschild e colaboradores. 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, 2011. 690 p. pg 137 – 140, 149, 160 – 161.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals - Part 2. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 1, n. 6, p. 262–268, 1998a.

GIRON, D. Contribution of thermal methods and related techniques to the rational development of pharmaceuticals - Part 1. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, v. 1, n. 5, p. 191–199, 1998b.

GOMES, A. P. B.; SOUZA, F. S.; MACÊDO, R. O. Thermal and dissolution kinetics of ampicillin drug and capsules. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 72, n. 2, p. 545–548, 2003.

HUANG, Y.; ALEXANDER, C. K.; DOLLIMORE, D. The thermal analysis study of the drug captopril. v. 368, n. November 1999, p. 43–58, 2001.

HUYNH-BA, K. **Handbook of Stability Testing in Pharmaceutical Development**. New York, NY: Springer New York, 2009. Pg. 10, 127, 132.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). **Q3a (R2): Impurities in New Drug Substances**. 2006. Disponível em: <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2__Guideline.pdf>. Acesso em: 25 mar. 2015.

JERREMALM, E.; HEDELAND, M.; WALLIN, I.; BONDESSON, U.; EHRSSON, H. Oxaliplatin Degradation in the Presence of Chloride: Identification and Cytotoxicity of the Monochloro Monooxalato Complex. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 5, p. 891-894, 2004.

KISSINGER, H. E. Reaction Kinetics in Differential Thermal Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1702–1706, 1957.

KOMMANABOYINA, B.; RHODES, C. T. Trends in Stability Testing, with Emphasis on Stability During Distribution and Storage. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 25, n. 7, p. 857–868, 1999.

LU, Y.; YANG, D.; LI, Z.; HANG, T.; SONG, M. Isolation and characterization of related substances in alogliptin benzoate by LC-QTOF mass spectrometric techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 128, p. 253–263, 2016.

MEDEIROS, A. C. D.; CERVANTES, N. A. B. de; GOMES, A. P. B.; MACEDO, R. O. Thermal stability of prednisone drug and tablets. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 64, p. 745–750, 2001.

MENDEZ, A.; CHAGASTELLES, P.; PALMA, E.; NARDI, N.; SHAPOVAL, E. Thermal and alkaline stability of meropenem: Degradation products and cytotoxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 350, p. 95-102, 2008.

MURAKAMI, F. S.; BERNARDI, L. S.; PEREIRA, R. N.; VALENTE, B. R.; VASCONCELOS, E. C.; CARVALHO FILHO, M. A. S.; SILVA, M. A. S. Comparative behavior studies of cinnamic acid using isothermal and nonisothermal kinetic methods. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 43, n. 12, p. 716–720, 2009.

OZAWA, T. A New Method of Analyzing Thermogravimetric Data. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 38, n. 11, p. 1881–1886, 1965.

RODANTE, F.; VECCHIO, S.; TOMASSETTI, M. Kinetic analysis of thermal decomposition for penicillin sodium salts - Model-fitting and model-free methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 29, n. 6, p. 1031–1043, 2002.

SILVA, M. A. S.; KELMANN, R. G.; FOPPA, T.; CRUZ, A. P.; BERTOL, C. D.; SARTORI, T.; GRANADA, A.; CARMIGNAN, F.; MURAKAMI, F. S. Thermoanalytical study of fluoxetine hydrochloride. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, n. 2, p. 463–467, 2007.

TAKEUCHI, H.; BABA M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 33, p. 61-71, 1991.

TITA, B.; FULIAS, A.; MARIAN, E.; TITA, D. Thermal Stability and Decomposition Kinetics Under Non-isothermal Conditions of Sodium Diclofenac. **Revista De Chimie**, v. 60, n. 5, p. 524–528, 2009.

TIȚA, B.; FULIAS, A.; BANDUR, G.; RUSU, G.; TITA, D. Thermal Stability of Ibuprofen . Kinetic Study Under Non - Isothermal Conditions. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 55, n. 9, p. 553–558, 2010.

ZHANG, K. MA, P.; JING, W.; ZHANG, X. A developed HPLC method for the determination of alogliptin benzoate and its potential impurities in bulk drug and tablets. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 2, p. 152–158, 2015.

ZHOU, Y. ZHOU, W.; SUN, L.; ZOU, Q.; WEI, P.; OUYANG, P. Characterization of process-related impurities including forced degradation products of alogliptin benzoate and the development of the corresponding reversed-phase high-performance liquid chromatography method. **Journal of Separation Science**, v. 37, n. 11, p. 1248–1255, 2014.

A caracterização físico-química de um fármaco é de extrema importância, especialmente quando não há monografia com os padrões/especificações farmacopeicas que um fármaco deve seguir. Nesse contexto a caracterização da ALG foi realizada. O fármaco apresentou faixa de fusão de 179,4 a 187,2 °C, seguida pelo processo de decomposição, que iniciou em 198,0 °C. A pureza ficou próxima a 99%. Os espectros de FTIR e difratogramas (XRPD) foram úteis para caracterizar o fármaco. O fármaco mostrou padrão cristalográfico de estado cristalino. Na análise de SEM/EDS o fármaco apresentou cristais irregulares e impurezas de cobre e chumbo. Essas impurezas provavelmente estão relacionadas com a qualidade da matéria-prima, pois nas rotas de síntese propostas por alguns autores, disponíveis na literatura, não existem etapas utilizando esses metais.

No estudo de compatibilidade entre o fármaco ALG e os excipientes presentes nos comprimidos disponíveis comercialmente, não foram observadas incompatibilidades com os excipientes croscarmelose sódica, celulose microcristalina e hidroxipropilcelulose. O estudo contou com análises por DSC, TGA, XRPD, FTIR e microscopia acoplada com aquecimento. Alterações foram observadas durante a análise por DSC na mistura com manitol, estearato de magnésio e no comprimido. O FTIR e XRPD dessas misturas não apresentaram alterações no perfil do fármaco, somente ocorreu o aparecimento de bandas adicionais relacionadas aos grupos presentes nos excipientes. A microscopia acoplada ao aquecimento demonstrou que a interação entre o manitol e a ALG e nos comprimidos ocorreu devido à solubilização do fármaco no excipiente fundido. O fármaco tem ponto de fusão de 183,3 °C. Na mistura fármaco e manitol, houve um adiantamento do ponto de fusão para 163,69 °C e esse adiantamento está relacionado à fusão do manitol. Esse fato também foi observado com os comprimidos. Na curva de DSC da mistura do estearato de magnésio com o fármaco foi observado um pequeno pico alargado, em 118,03 °C, que iniciou em 90,0 °C. Após a análise da microscopia com aquecimento, observou-se que o excipiente estearato de magnésio e o fármaco fundem em processos separados, onde o excipiente começa a fundir lentamente próximo aos 120 °C e essa fusão permanece ocorrendo de forma lenta até cerca de 180 °C e, o fármaco inicia sua fusão em

aproximadamente 179 °C. Esse alargamento da faixa de fusão resultou no desaparecimento do pico de fusão do fármaco na DSC.

Nenhuma incompatibilidade foi detectada e a ALG foi compatível com todos os excipientes testados. Esses dados são importantes para conhecer as características, estabilidade e compatibilidade do fármaco com seus excipientes, auxiliando no controle de qualidade do fármaco, nos estudos de pré-formulação, bem como na obtenção de uma formulação estável.

Foi realizada a validação de métodos analíticos por LC utilizando dois detectores diferentes (CAD e UV) e entre os parâmetros estudados foi realizado o teste de especificidade, submetendo a amostra a diferentes condições de estresse. No estudo de especificidade foi utilizado ácido fórmico 2 mol/L a 65 °C por 235 h, havendo a formação de um produto de degradação e degradação da ALG de cerca de 40%. Em intervalos menores a degradação foi monitorada, porém observou-se o pico do fármaco alargado, indicando que duas substâncias estavam eluindo no mesmo tempo de retenção. Além do ambiente ácido, para que houvesse degradação, foi necessário o uso de temperatura. Na hidrólise alcalina foi utilizado hidróxido de amônio 0,1 mol/L por 24 h a 25 °C e nessa condição a degradação do fármaco foi de cerca de 35%, não sendo observado o aparecimento de picos referentes a produtos de degradação no cromatograma. Além dessas, outras condições foram testadas, como por exemplo, hidróxido de amônio 1 ou 2 mol/L por 70 h a 65 °C, hidróxido de amônio 1 mol/L por 24 h a 65 °C, hidróxido de amônio 2 mol/L por 24 h a temperatura ambiente e houve degradação total do fármaco. Nessa última condição houve a formação de um pico majoritário. Optou-se pelo uso da base na concentração de 0,1 M, pois o fármaco mostrou-se mais sensível à hidrólise básica. Após oxidação utilizando H₂O₂ 6% por 24 h a 25 °C houve degradação de cerca de 40%, sem o aparecimento de picos adicionais relacionados a produtos de degradação. Utilizando H₂O₂ 8% por 24 h a 25 °C houve degradação total do fármaco. Utilizando água a 65 °C por 235 h o fármaco degradou cerca de 40%, com a formação de um pico de degradação semelhante ao obtido em condições de hidrólise ácida (mesmo tempo de retenção). Em hidrólise ácida, o fármaco foi mantido nessa mesma temperatura e por este mesmo período de tempo, ou seja, o produto de degradação formado pode estar relacionado à temperatura utilizada,

e não à condição ácida. Na luz UV (352 nm) a solução do fármaco, exposta por 15 dias, degradou cerca de 40% e ocorreu o aparecimento de um pequeno pico de degradação. Dessa forma, o fármaco mostrou-se mais sensível às hidrólises ácida, básica e neutra. Outros autores, utilizando outros ácidos e bases, e, condições menos drásticas do que as usadas em nosso estudo também relatam a degradação do fármaco principalmente em condições de hidrólise e oxidativa.

Os métodos analíticos por LC utilizando os detectores de CAD e UV apresentaram bons resultados em relação aos parâmetros linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão e especificidade, sem a interferência de excipientes e produtos de degradação na análise do fármaco. O detector UV mostrou-se um pouco mais sensível que o detector CAD (LQ de 8,84 e de 20,85 µg/ mL, respectivamente) e mais preciso (DPR inferiores). Antes do início das análises, foi necessário um tempo para estabilização do detector CAD, além da necessidade do uso de um percentual elevado de solvente orgânico na fase móvel, pois a fase móvel é nebulizada e evaporada. Apesar disso, ambos os métodos foram completamente validados e mostram-se adequados para avaliação de rotina do fármaco na forma de insumo farmacêutico ou de comprimidos. Os resultados mostraram que os métodos são intercambiáveis no intervalo de concentração utilizado. O sistema também se mostrou adequado ao avaliarmos a resolução, pratos teóricos e assimetria dos picos.

Após o estudo de estabilidade do fármaco ALG em altas temperaturas, foi observado que a velocidade de degradação independe da concentração do reagente, e é constante, ou seja, segue cinética de zero ordem. Os métodos utilizados por TGA e estufa/LC demonstram que a perda de massa está relacionada à perda química, pois foi obtida correlação quando os resultados foram comparados.

Os modelos matemáticos utilizados para o cálculo dos parâmetros cinéticos de degradação demonstraram variação. A E_a variou de 26 kcal/mol a 45 kcal/mol. Não foi possível calcular o prazo de validade, pois o estudo foi realizado em temperaturas muito elevadas, que favorecem reações químicas que não ocorrem em temperatura ambiente, além da complexidade das reações que ocorre em estado sólido. Além disso, outro fator de degradação como a umidade, que não foi avaliada neste estudo, pode aumentar a velocidade de degradação. Em solução, o fármaco sofre hidrólise,

conforme observado nos estudos de especificidade. Na ALG o anel pirimidina está presente e o nitrogênio está ligado a duas carbonilas, no qual poderiam ser susceptíveis a reação de hidrólise, pela presença da umidade.

Para análise rápida da estabilidade, o método termogravimétrico é o ideal, entretanto a interpretação dos resultados é complexa e imprecisa.

Mudanças na estabilidade podem trazer riscos à segurança do paciente, pois a quantidade de fármaco pode ser menor que a esperada, assim como, pode haver a formação de produtos tóxicos. Neste trabalho, em ensaios de citotoxicidade em células CRIB o fármaco degradado mostrou-se menos tóxico do que o fármaco não degradado.

Os ensaios realizados nesta tese permitem caracterizar adequadamente o fármaco ALG, e mostram-se adequados para o controle de qualidade de rotina, tanto da matéria-prima quanto dos comprimidos.

8 CONCLUSÕES

- A caracterização físico-química do fármaco é essencial;
- A faixa de fusão do fármaco variou de 179,4 a 187,2 °C, seguida pela decomposição (198,0 °C);
- A pureza do fármaco foi de cerca de 99%;
- O fármaco apresenta cristais irregulares, e impurezas de cobre e chumbo;
- Não foram observadas incompatibilidades entre a ALG e os excipientes testados (presentes nos comprimidos comerciais);
- Os métodos analíticos por LC utilizando dois detectores (CAD e UV) foram completamente validados de acordo com os parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão, precisão, robustez e especificidade, sem a interferência de excipientes e produtos de degradação na análise do fármaco. O detector de UV foi mais sensível e preciso que o CAD.
- No teste de especificidade a ALG mostrou-se mais sensível às condições de hidrólises ácida, básica e neutra;
- ALG segue uma cinética de degradação de zero ordem;
- Modelos matemáticos utilizados para o cálculo dos parâmetros cinéticos de degradação demonstraram variação. Não foi possível calcular o prazo de validade devido às altas temperaturas utilizadas, e além disso, outros fatores de degradação não foram avaliados;
- Para análise rápida da estabilidade, o método termogravimétrico é o ideal;
- O fármaco degradado mostrou-se menos tóxico do que o fármaco não degradado;
- Os ensaios realizados nesta tese permitem caracterizar adequadamente o fármaco ALG, e mostram-se adequados para o controle de qualidade de rotina, tanto da matéria-prima quanto dos comprimidos.