

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**Pauline Trindade Biscaino**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS  
PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE COMPRIMIDOS DE  
EMPAGLIFLOZINA E ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE**

Santa Maria, RS

2018

**Pauline Trindade Biscaino**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS  
PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE COMPRIMIDOS DE  
EMPAGLIFLOZINA E ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Andréa Inês Horn Adams

Santa Maria, RS  
2018

Biscaino, Pauline Trindade

Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de comprimidos de empagliflozina e estudo preliminar de estabilidade / Pauline Trindade Biscaino.- 2018.

97 p.; 30 cm

Orientador: Andréa Inês Horn Adams

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2018

1. Empagliflozina 2. Cromatografia eletrocinética micelar 3. Método analítico 4. Dissolução 5. Estudo preliminar de estabilidade I. Inês Horn Adams, Andréa II. Título.

**Pauline Trindade Biscaino**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS  
PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE COMPRIMIDOS DE  
EMPAGLIFLOZINA E ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

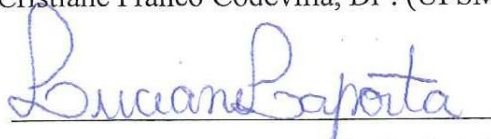
Aprovado em 27 de Março de 2018:



\_\_\_\_\_  
Andréa Inês Horn Adams, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)  
(Orientadora)



\_\_\_\_\_  
Cristiane Franco Codevilla, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)



\_\_\_\_\_  
Luciane Varini Laporta, Dr<sup>a</sup>. (UNIFRA)

Santa Maria, RS

2018

## DEDICATÓRIA

*Dedico à minha família, em especial minha mãe Gladis, pelo apoio constante, e a meu pai Jerônimo (in memoriam), que me transmitiu energia positiva durante toda essa trajetória.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar sempre comigo.

À professora Andréa Inês Horn Adams, que me acolheu, acreditando em mim, obrigada pela oportunidade, disponibilidade e por me ajudar e orientar sempre que precisei. Você foi muito importante para meu crescimento profissional. Gosto muito de você!

À minha mãe Gladis Maria Trindade Biscaino, que sem teu apoio, carinho e paciência nada teria acontecido. Obrigada mãe, por estar sempre comigo e nunca me deixar sozinha. Teu abraço é o meu melhor conforto, eu te amo muito.

Ao Daciano Bastos Lamberti, meu namorado, que esteve ao meu lado em todos os momentos dessa trajetória. Você foi meu incentivo e meu melhor consolo. Obrigada pelo apoio em todas as minhas decisões durante esse momento. Te amo!

Ao laboratório de pesquisa em Avaliação Biofarmacêutica e Controle de Qualidade, por me acolher desde o início do mestrado.

À minha colega de laboratório Ana Paula Christ, por todo apoio e por me ajudar sempre que precisei. Obrigada por tudo Lara, pela receptividade ao me receber no LabCQ e também amizade, até os últimos momentos do mestrado. Aprendi muito contigo!

As demais colegas de laboratório (Priscila Rosa, Juliana Santos, Suelen Burin, Letícia Macedo, Laís Scheeren e Ana Isa Pedroso) por deixarem meus dias mais felizes dentro do LabCQ. Obrigada gurias, por todo carinho durante esse tempo!

Às alunas de iniciação científica Alieni Bitencourt e Rebeca Lino, pela disponibilidade de sempre e por me ajudar em tudo que precisei. Vocês fazem parte dessa trajetória, e foram muito importantes no desenvolvimento das minhas práticas.

À colega de laboratório Daniele Rubert Librelotto, pelas análises de citotoxicidade.

Ao Ritiel Corrêa da Cruz, pela ajuda nas análises de CCD.

Ao Laboratório de Controle de Qualidade do Centro Universitário Franciscano (UNIFRA) de Santa Maria/RS, pelas análises de espectrofotometria no IV. Ao Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQIA) - Centro de Estudos em Petróleos (CEPETRO), pelas análises de espectrometria de massas. Ao NUQUIMHE - Núcleo de Química de Heterociclos, pelas análises de DSC.

“Nunca troque o que você quer na vida pelo o que você mais quer no momento.

Momentos passam, a vida continua.”

(Renato Russo)

## RESUMO

# DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE COMPRIMIDOS DE EMPAGLIFLOZINA E ESTUDO PRELIMINAR DE ESTABILIDADE

AUTORA: Pauline Trindade Biscaino

ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup> Andréa Inês Horn Adams

*Diabetes mellitus* (DM) é uma doença caracterizada por um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, que apresentam em comum a hiperglicemia. Para seu tratamento, estão disponíveis diferentes classes de antidiabéticos orais, entre eles a empagliflozina, pertencente à classe dos inibidores do cotransporte sódio-glicose 2 (SGLT-2). O fármaco obteve aprovação para uso no ano de 2014, para o tratamento do *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), e ainda são inexistentes monografias farmacopeicas para sua determinação como matéria-prima e/ou comprimidos. Sendo assim, o enfoque desse trabalho foi o desenvolvimento e validação de métodos quali e quantitativos para o controle de qualidade da empagliflozina em comprimidos. A substância química de referência (SQR) foi caracterizada através de métodos como: espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), espectrofotometria na região do infravermelho (IV), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e espectrometria de massas. Para identificação da empagliflozina nos comprimidos foram realizados métodos qualitativos como: espectrofotometria no UV, cromatografia em camada delgada (CCD) e eletroforese capilar (EC). Para a análise quantitativa dos comprimidos, foi desenvolvido e validado método por cromatografia eletrocínica micelar (MEKC), utilizando capilar de sílica (40 cm de comprimento efetivo e 50 µm de diâmetro interno), mantido a 28°C, voltagem +28 kV, injeção hidrodinâmica de 50 mBar por 4 segundos, utilizando solução eletrolítica composta de tampão tris hidroximetil amino metano 20 mM e dodecil sulfato de sódio (SDS) 100 mM (1:1) pH 10, com detecção em 225 nm. A validação foi realizada de acordo com as guias vigentes, avaliando os parâmetros: especificidade, linearidade, precisão, exatidão e robustez, sendo que todos os parâmetros atenderam os requisitos. As condições analíticas propiciaram análises com tempo de seis minutos, e o método mostrou-se linear ( $r=0.9999$ ) na faixa de 50-150 µg/mL, exato (recuperação média=100,60%), preciso (DPR intra-dia 0,79% e entre-dias 0,85%), específico e robusto. Através dos estudos preliminares de estabilidade, verificou-se que o fármaco degrada lentamente nas condições usuais de degradação forçada, sendo que a degradação em meio ácido e alcalino apresentou cinética de 1ª ordem, com  $t_{90\%}$  de 25,4h e 24,70h, respectivamente. A análise de citotoxicidade de soluções do fármaco e de soluções submetidas à degradação evidenciou leve decréscimo da viabilidade celular para soluções expostas à radiação UVC e meio alcalino. O método de dissolução por espectrofotometria no UV foi desenvolvido e validado de acordo com a USP 39 (2016), tendo sido otimizadas as seguintes condições: 900 mL de tampão fosfato 0,025 M pH 6,86, mantido a 37°C ± 0,5 °C como meio de dissolução, aparato II (pás), com velocidade de rotação 40 rpm e detecção em 225 nm.

**Palavras-chave:** Empagliflozina. MEKC. Validação. Dissolução. Estabilidade.



## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS FOR QUALITY CONTROL OF EMPAGLIFLOZIN TABLETS AND PRELIMINARY STABILITY STUDY

AUTHOR: Pauline Trindade Biscaino  
ADVISER: Dr<sup>a</sup> Andréa Inês Horn Adams

Diabetes mellitus (DM) is a disease characterized by a heterogeneous group of metabolic disorders, which present hyperglycemia in common. Different classes of oral antidiabetics, such as empagliflozin, belonging to the class of cotransport inhibitors of sodium-glucose 2 (SGLT-2), are available for treatment. The drug was approved for use in 2014 for the treatment of diabetes mellitus type 2 (DM2), and there are no pharmacopoeial monographs for its determination as raw material and/or tablets. Thus, the focus of this work was the development and validation of qualitative and quantitative methods for the quality control of empagliflozin tablets. The chemical reference substance (SQR) was characterized by methods such as ultraviolet (UV) spectrophotometry, infrared (IV) spectrophotometry, differential scanning calorimetry (DSC) and mass spectrometry. For the identification of the empagliflozin in the tablets, qualitative methods were performed: spectrophotometry (UV), thin layer chromatography (CCD) and capillary electrophoresis (CE). For the quantitative analysis of the tablets, a micellar electrokinetic (MEKC) method was developed and validated using silica capillary (40 cm effective length and 50  $\mu\text{m}$  internal diameter), maintained at 28°C, voltage +28 kV, hydrodynamic injection of 50 mBar for 4 seconds using electrolytic solution composed of 20 mM tris hydroxymethyl amino methane buffer and 100 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) (1:1) pH 10, with detection at 225 nm. The validation was performed according to the current guidelines, evaluating the parameters: specificity, linearity, accuracy, precision, and robustness, and all parameters met the requirements. The analytical conditions provided a six-minute analysis, and the method was linear ( $r=0.9999$ ) in the range of 50-150  $\mu\text{g/mL}$ , accurate (mean recovery=100.60%), precise (RSD intrad-day 0.79% and inter-day 0.85%), specific and robust. By preliminary stability studies, it was verified that the drug degrades slowly under the usual conditions of forced degradation, and degradation in acidic and alkaline media presented first-order kinetics with  $t_{90\%}$  of 25.4 and 24.7 h, respectively. The cytotoxicity analysis of solutions of the drug and solutions submitted to degradation showed a slight decrease in cell viability for solutions exposed to UVC and alkaline media. The method of dissolution by UV spectrophotometry was developed and validated according to USP 39 (2016), and the following conditions were optimized: 900 mL of 0.025 M phosphate buffer pH 6.86, maintained at 37 °C  $\pm$  0.5 °C as dissolution medium, apparatus II (blades), with rotational speed 40 rpm and detection at 225 nm.

**Keywords:** Empagliflozin. MEKC. Validation. Dissolution. Stability.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA

- Figura 3.1 - Estrutura química da Empagliflozina..... 24

### CAPÍTULO I

- Figura 4.1 - Curva de aquecimento por DSC para matéria-prima de Empagliflozina..... 37

- Figura 4.2 - Espectro de absorção na região do UV da empagliflozina, diluída em metanol (—), ácido clorídrico 0,1 M (— --), hidróxido de sódio 0,1 M (—) e água ultrapura (---), na concentração de 25 µg/mL..... 38

- Figura 4.3 - Espectro de absorção na região do UV de empagliflozina (Ayoub, 2016), diluída em metanol, na concentração de 5µg/mL..... 38

- Figura 4.4 - Espectro da região do infravermelho da empagliflozina SQR..... 39

- Figura 4.5 - Espectro de massas da empagliflozina..... 41

- Figura 4.6 - Espectro de absorção na região do UV da SQR (—) e amostra (---) de empagliflozina em metanol (1), em ácido (2) e em água (3), na concentração de 25 µg/mL..... 42

- Figura 4.7 - Placas cromatográficas (CCD). (1) SQR empagliflozina, (2) amostra empagliflozina, (3) amostra degradada em luz UVC (254 nm) durante 5 horas, (4) solução placebo dos excipientes. Fase móvel: acetato de etila:metanol (9:1, v/v). (A) Detecção luz UV. (B) Detecção ácido sulfúrico. (C) Detecção iodo..... 43

- Figura 4.8 - Eletroferograma da SQR (A) e amostra (B) de empagliflozina, na concentração de 1000 µg/mL..... 45

### CAPÍTULO 2

- Figure 1 - Chemical structure of empagliflozin and electropherograms from empagliflozin solutions exposed to stress testing. (A) Empagliflozin standard solution. (B) Empagliflozin sample solution non degraded; (C) Empagliflozin sample solution after exposure to UVA light (48 h); (D) Empagliflozin sample solution after exposure to UVC light (5 h). EOF: electroosmotic flow; IS: internal standard; DP1: degradation product 1; DP2: degradation product 2; DP3: degradation product 3..... 63

- Figure 2 - Pareto plot of standardized effects (response is teor;  $\alpha=0.05$ )..... 63

- Figure 3 - Stability of empagliflozin solutions on stress test, evaluated during a 8-day period..... 63

Figure 5 - Mean cell viabilities (%) of the degradations analyzed in two times and three concentrations. *significant response compared to the respective non-degradaded sample ( $p < 0.05$ ).....	64
---	----

### **CAPÍTULO 3**

Figure 1 - Chemical structure of empagliflozin.....	77
Figure 2 - Dissolution profiles of empagliflozin tablets: (A) 0.025 M phosphate buffer pH 6.86, 0.01 M HCl, 0.5% LSS using apparatus II at 50 rpm, in 900 mL medium. (B) 0.025 M phosphate buffer pH 6.86, 0.01 M HCl, using apparatus II at 40 rpm, in 900 mL medium.....	77
Figure 3 - Dissolution profiles with 0.025 M phosphate buffer pH 6.86 medium, using rotation values of 40 rpm and 50 rpm.....	77

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 7.1 - Resultados da avaliação do método de remoção dos excipientes para as soluções analíticas do teste de dissolução.....	84
---	----

### CAPÍTULO 2

Table 1 - Results of recovery for the MEKC method.....	64
--	----

### CAPÍTULO 3

Table 1 - Percentual values of the dissolution profiles of empagliflozin tablets 25 mg (n =6), developed in 0.025 M phosphate buffer and 0.01M HCl.....	77
Table 2 - Results of recovery for the UV method.....	78
Table 3 - Intermediate precision results of the dissolution method (n=6/time).....	78

## LISTA DE QUADROS

### REVISÃO DA LITERATURA

Quadro 3.1 - Métodos de determinação quantitativa de empagliflozina.....	26
Quadro 3.2 - Classificação dos testes e sua finalidade.....	29
Quadro 3.3 - Ensaio necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade.....	30
Quadro 3.4 - Equações das reações de degradação.....	31

### CAPÍTULO 1

Quadro 4.4 - Frequência e atribuição para principais bandas do espectro de IV da empagliflozina.....	40
Quadro 4.5 - Condições utilizadas para identificação da empagliflozina por MEKC.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAS	Chemical Abstract Substance
CCD	Cromatografia em camada delgada
CZE	Eletroforese capilar de zona
CG	Cromatografia a gás
DAD	Detector de arranjo de diodos
DCB	Denominação Comum Brasileira
d.i.	Diâmetro interno
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DPR	Desvio padrão relativo
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
EC	Eletroforese capilar
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
EMPA	Empagliflozina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GLP-1	Miméticos do peptídeo similar ao glucagon tipo 1
HPLC	Cromatografia a líquido de alta eficiência
ICH	<i>International Conference on Harmonisation</i>
IDF	International Diabetes Federation
IV	Infravermelho
k	Constante de degradação
LC-MS/MS	Cromatografia a líquido acoplada ao detector massas
LSS	Lauril sulfato de sódio
MeOH	Metanol
MP	Matéria-prima
MEKC	Cromatografia eletrocinética micelar
OMS	Organização Mundial de Saúde
r	Coefficiente de correlação de Pearson
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SGLT	Inibidores do cotransporte sódio-glicose
SGLT-1	Inibidores do cotransporte sódio-glicose 1
SGLT-2	Inibidores do cotransporte sódio-glicose 2
SQR	Substância química de referência
SUS	Sistema Único de Saúde
UV	Ultravioleta
UPLC	Cromatografia a líquido de ultra eficiência
VIS	Visível

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 OBJETIVO GERAL .....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	21
3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	21
<b>3.1.1 Diabetes mellitus (DM)</b> .....	21
<b>3.1.2 Tratamento para Diabetes mellitus</b> .....	22
<b>3.1.3 Inibidores do SGLT-2</b> .....	22
3.2 EMPAGLIFLOZINA .....	23
3.2.1 Aspectos gerais.....	23
3.2.2 Descrição .....	24
3.2.3 Apresentação.....	24
3.2.4 Mecanismo de ação.....	25
3.2.5 Farmacocinética .....	25
3.2.6 Reações adversas .....	25
3.2.7 Métodos analíticos de determinação da empagliflozina.....	26
3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS E VALIDAÇÃO .....	27
3.4 ESTUDOS DE ESTABILIDADE.....	30
3.5 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO.....	31
<b>4. CAPÍTULO I – Caracterização da SQR e análise qualitativa dos comprimidos de empagliflozina</b> .....	34
4.1 INTRODUÇÃO .....	35
4.2 DESCRIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA .....	35
4.3 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA .....	36
4.4 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA DE EMPAGLIFLOZINA .....	36
<b>4.4.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</b> .....	36
<b>4.4.2 Espectrofotometria da região do ultravioleta (UV)</b> .....	37
<b>4.4.3 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)</b> .....	38
<b>4.4.4 Espectrometria de massas</b> .....	40
4.5 ANÁLISE QUALITATIVA DOS COMPRIMIDOS DE EMPAGLIFLOZINA .....	41
<b>4.5.1 Espectrofotometria no ultravioleta</b> .....	41
<b>4.5.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)</b> .....	42
<b>4.5.3 Eletroforese capilar (EC)</b> .....	44
4.6 CONCLUSÕES.....	45
4.7 REFERÊNCIAS .....	46
<b>5. CAPÍTULO II – Artigo I</b> .....	47
<b>6. CAPÍTULO III – Artigo II</b> .....	65
<b>7. DISCUSSÃO GERAL</b> .....	81
<b>8. CONCLUSÕES</b> .....	87
<b>9. REFERÊNCIAS</b> .....	90





## 1. INTRODUÇÃO

O *diabetes mellitus* (DM) é uma doença que apresenta excesso de glicose no sangue (glicemia) e também na urina (glicosúria), sendo caracterizada por um grupo heterogêneo de distúrbios metabólicos, que apresentam em comum a hiperglicemia (FIGUEIREDO, 2009).

Atualmente, o diabetes é classificado de acordo com a etiologia em diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, outros tipos específicos e diabetes gestacional. A classificação baseada no tipo de tratamento (diabetes insulino-dependente ou diabetes insulino-independente) não é mais recomendada (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; CONCEIÇÃO; SILVA; BARBOSA, 2017; MILECH et al., 2016).

O diabetes tipo 2 (DM2) é uma doença crônica e progressiva, com alta prevalência no mundo, acometendo cerca de 18 a 20% dos adultos com mais de 65 anos, sendo que corresponde a 90-95% dos casos de diabetes. O tratamento da DM2 é feito com antidiabéticos orais, sendo que atualmente existem oito classes terapêuticas disponíveis para esse fim (MILECH et al., 2016).

A empagliflozina pertence à classe dos inibidores do cotransporte sódio-glicose 2 (SGLT-2), e sua ação principal consiste em inibir a reabsorção renal de glicose (CONCEIÇÃO; SILVA; BARBOSA, 2017; DRUGBANK, 2017; MILECH et al., 2016). Foi aprovada em 2014 para uso no tratamento do DM2 e até o momento, são inexistentes monografias farmacopeicas para sua análise, tanto em comprimidos como matéria-prima, o que motivou a realização deste trabalho. Para novas substâncias, informações sobre a estabilidade e métodos empregados para o controle de qualidade geralmente são mantidos em sigilo pelos detentores da patente do fármaco. Portanto, enquanto aguarda-se a publicação destes estudos, a qualidade do produto depende da seriedade do laboratório produtor e dos órgãos responsáveis pela liberação do registro do medicamento (BAKSHI, 2002).

Quando esse projeto foi iniciado, no ano de 2016, não haviam sido reportados métodos analíticos focados na análise do produto. Essa situação mudou rapidamente, e atualmente são relatados diversos métodos quantitativos para análise da empagliflozina, entre eles, métodos por cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) (GEETHA et al., 2016; GHANY ABDEL et al., 2017; PADMAJA; VEERABHADRAM, 2016; SHYAMALA et al., 2016), cromatografia a líquido de ultra eficiência (UPLC) (AYOUB, 2015; GOPAL; SRIDHAR, 2017; PADMAJA; VEERABHADRAM, 2017), espectrofotometria no ultravioleta (UV) (AYOUB, 2016; AYOUB, 2017; PADMAJA; VEERABHADRAM, 2015), e cromatografia a líquido acoplada ao detector massas (LC-MS/MS) (AYOUB; MOWAKA, 2017). Entretanto, ainda não

existem métodos desenvolvidos por eletroforese capilar (EC), tampouco citações sobre estudos de dissolução dos comprimidos.

Nesse sentido, considerando sua recente aprovação e a carência de informações farmacopeicas para análise da empagliflozina, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar o primeiro método da literatura por cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) indicativo de estabilidade para o controle de qualidade de comprimidos de empagliflozina, assim como realizar um estudo preliminar da estabilidade do fármaco, avaliando a citotoxicidade dos produtos de degradação. Adicionalmente, desenvolver e validar ensaio de dissolução, para avaliar a propriedade de liberação *in vitro* dos comprimidos revestidos de empagliflozina.

O desenvolvimento de métodos analíticos para o controle de qualidade de comprimidos de empagliflozina possibilita ações de farmacovigilância, em função da monitoração da qualidade do medicamento disponível no mercado, bem como, de outros que poderão vir a ser introduzidos, com o fim da proteção da patente. Estudos de estabilidade preliminares indicarão a resistência do fármaco a hidrólises ácida e alcalina, temperatura, fotólise e à oxidação, fornecendo assim informações relevantes para o desenvolvimento de produtos contendo empagliflozina. Além disso, o teste de dissolução irá possibilitar a avaliação da liberação da substância ativa da formulação, sendo igualmente importante para garantir a reprodutibilidade entre lotes.

A escolha da MEKC como método de doseamento para empagliflozina se justifica pela ampla aplicação, boa sensibilidade e baixo consumo de amostras e reagentes. Além disso, o EC apresenta alta capacidade de resolução na análise de amostras complexas, como as que podem ser geradas nos estudos de estabilidade. Com isso, o conjunto de dados obtidos pelo desenvolvimento desse trabalho visa contribuir para que os medicamentos distribuídos à população atendam os requisitos que os tornam aptos ao consumo.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar métodos analíticos para realizar o controle de qualidade de comprimidos de empagliflozina e realizar estudos preliminares de estabilidade.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a matéria-prima usada como substância química de referência (SQR) através de testes como calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectrofotometria no infravermelho (IV), espectrofotometria no ultravioleta (UV) e espectrometria de massas;
- Desenvolver métodos qualitativos para avaliação de comprimidos de empagliflozina;
- Desenvolver e validar método por eletroforese capilar indicativo de estabilidade, através do mecanismo de separação por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), para doseamento do fármaco em comprimidos;
- Realizar estudo de estabilidade do fármaco, sob condições de degradação forçada como: radiação, calor, meios alcalino, ácido e oxidante;
- Determinar a cinética das reações de degradação nas condições que se mostrarem mais adversas ao fármaco;
- Avaliar a citotoxicidade de soluções do fármaco e de soluções que contenham os produtos de degradação, formados nos estudos de degradação forçada;
- Desenvolver e validar método de dissolução para comprimidos de empagliflozina, por espectrofotometria no UV.



### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS**

##### **3.1.1 Diabetes mellitus (DM)**

O DM é considerado um problema de saúde crônico, sistêmico, multifatorial e de difícil controle, podendo deixar várias sequelas, sendo um grave problema de saúde no mundo todo. Com isso, é de fundamental importância um trabalho contínuo junto aos pacientes, visando maior adesão ao tratamento e a prevenção de complicações crônicas decorrentes da doença (TORRES et al., 2007).

O aparecimento de hiperglicemia em pacientes com DM resulta de defeitos na ação da insulina ou na secreção desta, ou em ambas, e é manifestada por sintomas como poliúria, polidipsia, perda de peso, polifagia, visão turva ou por complicações agudas, que quando não tratadas podem levar a risco de morte, pelo desenvolvimento de cetoacidose diabética ou coma hiperosmolar (MOTTA, 2009). Além disso, a hiperglicemia crônica está associada com danos a longo prazo, como disfunção e falência dos órgãos, principalmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos (FORBES; COOPER, 2013; SARAIVA et al., 2016; TAHARA et al., 2017).

Existem duas formas principais do diabetes, o DM tipo 1 (DM1) e o DM tipo 2 (DM2), embora também possa se manifestar durante a gravidez e sob outras condições (FORBES; COOPER, 2013). No DM1 ocorre destruição das células beta pancreáticas com consequente deficiência de insulina, sendo que, muitas vezes, essa destruição ocorre por processo autoimune (5-10% dos casos). No DM2 ocorre uma incapacidade das células beta em responder a alta demanda periférica de insulina, e a hiperglicemia resulta de dois mecanismos: resistência periférica à ação da insulina e deficiência da produção deste hormônio pelas células beta do pâncreas (90-95% dos casos). Predisposição genética, sobrepeso e obesidade, sedentarismo, envelhecimento, entre outros, são fatores de risco que podem agravar esses mecanismos (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014; CONCEIÇÃO; SILVA; BARBOSA, 2017; MILECH et al., 2016).

No Brasil, no final da década de 80, um estudo multicêntrico mostrou que 7,5% das pessoas entre 30 e 69 anos foram diagnosticadas com DM (MALERBI; FRANCO, 1992). Em 2013, estudo demonstrou que a prevalência da DM no Brasil variava de 4,7% a 17,9%

(BERTOLDI et al., 2013). Em nível global, a população diabética já ultrapassa 380 milhões de pessoas, podendo chegar a mais de 600 milhões em 2030 (BURGGRAAF; CABEZAS, 2017).

### 3.1.2 Tratamento para Diabetes mellitus

O objetivo da terapia para o tratamento do DM é manter os níveis plasmáticos de glicose próximo e/ou dentro dos valores normais, a fim de prevenir ou retardar o aparecimento de complicações micro e macrovasculares (DALAMA; MESA, 2016). Para o tratamento do DM1, devido à incapacidade do pâncreas em produzir insulina, é necessária a reposição desse hormônio, sendo imprescindível o tratamento com insulina. Já o tratamento do DM2 é feito com medicamentos orais, os quais são classificados como antidiabéticos orais, muitas vezes sendo necessária a introdução da insulino terapia (MILECH et al., 2016).

Antidiabéticos orais possuem como meta a normoglicemia, ou seja, são substâncias que ao serem ingeridas, têm por finalidade reduzir a glicemia e assim, mantê-la em níveis normais (jejum <100 mg/dL e pós-prandial <140 mg/dL) (GAEDE et al., 2008; MILECH et al., 2016).

De acordo com o mecanismo de ação principal, os fármacos antidiabéticos orais eram classificados em: (1) sulfoniluréias e (2) glinidas, as quais incrementam a secreção pancreática de insulina; (3) inibidores das alfa-glicosidases, que reduzem a velocidade de absorção de glicídios; (4) biguanidas, as quais diminuem a produção hepática de glicose; (5) glitazonas, que aumentam a utilização periférica de glicose. Mais recentemente, a essas classes foram adicionadas as seguintes: (6) gliptinas, cujo mecanismo de ação baseia-se na inibição da DPP-4 (enzima dipeptidil peptidase) e que promovem aumento da síntese e secreção de insulina, além da redução de glucagon; (7) miméticos e análogos do GLP-1 (*glucagon-like-peptide-1*), que aumentam a secreção de insulina apenas quando a glicose se eleva e controlam os níveis de glucagon, e (8) inibidores do cotransporte sódio-glicose 2 (SGLT2), os quais inibem a recaptação de glicose nos rins, reduzem a glicemia e promovem glicosúria (CONCEIÇÃO; SILVA; BARBOSA, 2017; MILECH et al., 2016).

### 3.1.3 Inibidores do SGLT-2

Embora a resistência à insulina e os defeitos de secreção da insulina desempenham papel importante na patogênese da hiperglicemia, outros problemas metabólicos contribuem para o agravamento do estado do paciente com DM, como o aumento da reabsorção renal da glicose (MUDALIAR et al., 2015). O processo de reabsorção da glicose, a partir do filtrado glomerular,

é dependente da ação dos co-transportadores de sódio e glicose (SGLT), moléculas proteicas que constituem uma família de seis subtipos de transportadores, sendo os mais importantes os SGLT-1 e SGLT-2 (BORON; BOULPAEP, 2015).

Os SGLT-1 são transportadores de alta afinidade e baixa capacidade de transportar glicose, responsáveis pela absorção de glicose no intestino delgado e por 10% a 20% da reabsorção renal de glicose. Já os SGLT-2 são transportadores de baixa afinidade e alta capacidade de transportar glicose, localizados no túbulo proximal do néfron, sendo responsáveis por 80% a 90% da reabsorção renal de glicose (BORON; BOULPAEP, 2015; GERICH, 2010).

Inibidores de SGLT-2 inibem a reabsorção renal de glicose, promovendo glicosúria, resultando na diminuição dos níveis plasmáticos de glicose de forma independente da ação da insulina. Ou seja, o mecanismo de ação desses fármacos não depende das células beta do pâncreas, podendo melhorar a função dessas células e a ação da insulina, evitando o fenômeno de glicotoxicidade (DALAMA; MESA, 2016; NAUCK, 2014). Por esta razão, os fármacos da classe podem ser utilizados em associação com outros antidiabéticos (MUSCELLI et al., 2016).

Existem três fármacos aprovados da classe dos inibidores de SGLT-2, todos disponíveis comercialmente no Brasil: a canagliflozina, aprovada pela Food and Drug Administration (FDA), em março de 2013; a dapagliflozina, aprovada em janeiro de 2014, e a empagliflozina, em agosto de 2014. A dapagliflozina e empagliflozina são altamente seletivos para SGLT-2, enquanto que a canagliflozina bloqueia tanto SGLT-1 quanto SGLT-2. Destes três fármacos, a empagliflozina é o que possui maior seletividade para SGLT-2 (>2.500 vezes) em comparação com SGLT-1 (DALAMA; MESA, 2016; SHUBROOK et al., 2015; WHALEN et al., 2015).

## 3.2 EMPAGLIFLOZINA

### 3.2.1 Aspectos gerais

A empagliflozina tem demonstrado eficácia e segurança na redução da glicose quando administrada como monoterapia, ou quando administrada associada a antidiabéticos orais ou com insulino terapia (HEISE et al., 2013; WHALEN et al., 2015). Quando associada com metformina, tem se mostrado eficaz na melhora dos níveis da hemoglobina glicada (HbA1C) e glicose plasmática em jejum. É um fármaco capaz de diminuir os níveis de glicose e insulina no plasma, melhorando assim a função das células beta do pâncreas (MUSCELLI et al., 2016). Além disso, apresenta baixo risco de hipoglicemia, está associada com a perda de peso (1 a 5



kg), especialmente em pacientes crônicos, e redução da pressão sistólica (3 a 6 mmHg), sem que haja aumento da frequência cardíaca (MOSLEH et al., 2017; WHALEN et al., 2015). É um fármaco que possui efeitos favoráveis sobre os marcadores da rigidez arterial e resistência vascular, adiposidade visceral, albuminúria e urato do plasma e, além disso, tem sido associada com aumento dos níveis das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e lipoproteína de alta densidade (HDL) (ZINMAN et al., 2015).

Estudos realizados por Heise e colaboradores (2016) demonstraram que, a empagliflozina, em pacientes com DM2, produziu controle da glicemia, redução do peso e melhora na pressão arterial sistólica. A perda de peso foi associada à perda de fluidos e calorias, por meio do aumento da excreção de glicose na urina (MILECH et al., 2016).

### 3.2.2 Descrição

*DCB:* empagliflozina

*CAS:* 864070-44-0

*Fórmula molecular:* C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>ClO<sub>7</sub>

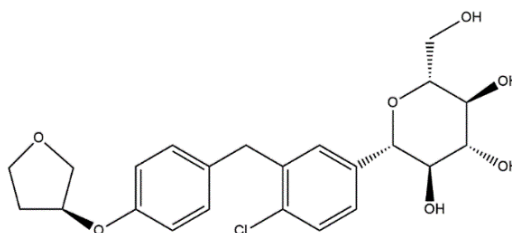
*Estrutura química:* ver figura 3.1

*Massa molecular:* 450,91

*pKa:* 13,23 ± 0,7

*Características físico-químicas:* pó branco, com log P=1,163 ± 0,534, solubilidade 0,045g/L (45µg/mL), sendo classificado como fármaco Classe III (alta solubilidade e baixa permeabilidade), no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (MACHA et al., 2013).

Figura 3.1 - Estrutura química da empagliflozina



### 3.2.3 Apresentação

A empagliflozina é comercializada como comprimidos revestidos de 10 mg ou 25 mg (Jardiance®, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals), em embalagens contendo 10 ou 30 comprimidos. Os excipientes presentes na formulação são lactose monoidratada, celulose microcristalina, hiprolose, croscarmelose sódica, dióxido de silício, estearato de magnésio, hipromelose, dióxido de titânio, talco, macrogol e óxido de ferro amarelo. Os comprimidos

devem ser mantidos em temperatura de 15°C a 30°C (MILECH et al., 2016). A dose inicial recomendada é de 10 mg (um comprimido por dia) uma vez por dia, sendo que a dose máxima deve ser de 25 mg/dia, podendo ser administrado em qualquer hora do dia, com ou sem alimentos (GALLWITZ, 2017; MILECH et al., 2016).

### **3.2.4 Mecanismo de ação**

Por inibir o SGLT-2, a empagliflozina reduz a reabsorção renal de glicose e promove sua eliminação pela urina. O mecanismo de ação da empagliflozina é independente da função das células beta do pâncreas e da secreção da insulina, o que contribui para um baixo risco de hipoglicemia (DRUGBANK, 2017; SCIFINDER, 2017).

### **3.2.5 Farmacocinética**

O fármaco é absorvido rapidamente após administração oral, apresentando picos de concentração máxima (C<sub>max</sub>) no plasma após 1,0 à 2,1 horas, possuindo meia-vida de aproximadamente 13 horas, tornando possível uma dose diária. A administração do fármaco nas concentrações de 10 mg ou 25 mg induz glicosúria de aproximadamente 66,4 g e 78,4 g/dia e, além disso, produz perda de calorías entre 265 kcal e 313 kcal/dia, respectivamente (DALAMA; MESA, 2016; DRUGBANK, 2017; GALLWITZ, 2017).

### **3.2.6 Reações adversas**

De modo geral, a empagliflozina é bem tolerada sendo que a maioria dos efeitos adversos são transitórios e incluem poliúria, sede com desidratação, hipotensão e dor de cabeça, ocorrendo geralmente na fase inicial do tratamento (ZHAO et al., 2015). Entretanto, pode ocorrer um aumento na ocorrência de infecções urogenitais por fungos, particularmente em mulheres, e infecção urinária (CERSOSIMO; HERRERA-SOLIS; TRIPLITT, 2014; MILECH et al., 2016). Este medicamento deve ser usado com cautela em pacientes com disfunção renal moderada a grave (com taxa de filtração glomerular estimada persistentemente inferior a 45mL/min/1,73m<sup>2</sup> ou depuração de creatinina menor ou igual a 60 mL/min), já que a metabolização é renal (CERSOSIMO; HERRERA-SOLIS; TRIPLITT, 2014; DRUGBANK, 2017; GALLWITZ, 2017; MILECH et al., 2016).

Recentemente, o FDA e a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), publicaram um alerta sobre a classe dos inibidores de SGLT-2, o qual fala sobre o possível risco de cetoacidose diabética em alguns pacientes com DM2 (GALLWITZ, 2017; MILECH et al., 2016).

### 3.2.7 Métodos analíticos de determinação da empagliflozina

Em relação ao desenvolvimento de métodos, foram reportados na literatura métodos analíticos por técnicas como cromatografia a líquido de alta eficiência (do inglês, high performance liquid chromatography-HPLC), espectrofotometria no ultravioleta (UV), cromatografia a líquido de ultra eficiência (do inglês, ultra performance liquid chromatography-UPLC) e cromatografia a líquido acoplada ao detector de massas (do inglês, liquid chromatography-mass spectrometry-LC-MS/MS), desenvolvidos para o doseamento da empagliflozina como matéria-prima e/ou comprimidos, e também em associação com outros fármacos antidiabéticos. Os dados destes trabalhos estão sumarizados no Quadro 3.1.

Quadro 3.1 - Métodos para determinação quantitativa de empagliflozina

<b>Matriz</b>	<b>Método</b>	<b>Condições</b>	<b>Autores</b>
Comp. de empagliflozina, linagliptina e cloridrato de metformina	UPLC	f.m.: TF de potássio pH 4:MeOH (50:50) Diluyente: MeOH Coluna: C-18 Detecção: 225 nm Vazão: 0,4 mL/min	Ayoub, 2015
Comp. de empagliflozina + linagliptina	Espectrofotometria no UV, análise simultânea	Diluyente: MeOH Detecção: empagliflozina, 233 nm e linagliptina, 277 nm	Padmaja; Veerabhadram, 2015
Comp. de empagliflozina + metformina	Espectrofotometria no UV derivada, análise simultânea	Diluyente: MeOH Detecção: empagliflozina, 225 nm e metformina, 237 nm	Ayoub, 2016
Comp. de empagliflozina + metformina	HPLC	f.m.: TF de potássio pH 4,8:ACN:MeOH (15:80:5) Diluyente: MeOH Coluna: C-18 Detecção: 227 nm Vazão: 1 mL/min	Geetha et al., 2016
Comp. de empagliflozina e metformina	Espectrofotometria no UV-análise simultânea	Diluyente: MeOH	Ayoub, 2016

		Detecção: 223 nm (empagliflozina) e 233 nm (metformina)	
Comp.de empagliflozina e linagliptina	HPLC	f.m.: Ácido fórmico: MeOH: ACN (40:20:40) pH 3,6 Coluna: C-18 Detecção: 226 nm Vazão: 2 mL/min	Ghany Abdel et al., 2017
Comp. de empagliflozina e metformina	UPLC-ESI-MS/MS, análise simultânea	f.m.: ácido fórmico 0,1%: ACN (75:25, v/v) Coluna: Bridged Ethylene Hybrid (BEH) C-18 (1,7 µm) Vazão: 0,2mL/min	Ayoub; Mowaka, 2017
MP e Comp. de empagliflozina e metformina	UPLC	f.m.: tampão ácido ortofosfórico 0,1% pH 3,4: MeOH (40:60% v/v) Coluna: Bridged Ethylene Hybrid (BEH) para UPLC Vazão: 0,25 mL/min. Detecção: 254 nm	Padmaja; Veerabhadram, 2017
MP e comp. de cloridrato de metformina e empagliflozina	UPLC	f.m.: TF pH 4:MeOH (30:70, v/v) Coluna: C-18 Detecção: 240 nm Vazão: 1 mL/min	Gopal; Sridhar, 2017
Empagliflozina, MP	HPLC	f.m.: ácido ortofosfórico 0,1%: ACN (70:30) Coluna: Hypersil BDS Detecção: 233 nm Vazão: 1mL/min	Shyamala et al., 2016
Empagliflozina, MP	HPLC	f.m.: tampão acetato:MeOH (30:70) Coluna: C-18 Detecção: 260 nm Diluyente: MeOH	Padmaja; Veerabhadram, 2016

Legenda: comp.: comprimidos; MP: matéria-prima; TF: tampão fosfato; f.m.: fase móvel; MeOH: metanol; ACN: acetonitrila.

### 3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS QUANTITATIVOS E VALIDAÇÃO

Métodos analíticos aplicados a medicamentos devem permitir uma análise completa do produto, contemplando aspectos como o doseamento da substância ativa, a verificação da

estabilidade da substância ativa na formulação, e também, a determinação dos níveis de impurezas (ICH, 2002; ICH, 2003; WATSON, 2005). Para medicamentos em que a dose máxima diária é inferior a 2,0 g, como é o caso do empagliflozina, recomenda-se que os métodos quantitativos sejam capazes de detectar impurezas presentes em baixa concentração (<0,15%) (ICH, 2003; RAO et al., 2007). Nesse sentido, se faz necessário o uso de métodos sensíveis e específicos, como a eletroforese capilar (EC), a cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC), a cromatografia a gás (CG), entre outros, capazes de quantificar o fármaco de modo inequívoco em meio a impurezas, ainda que essas estejam presentes em baixas concentrações.

HPLC ainda é a técnica mais usada para a quantificação de fármacos em formulações, devido às vantagens que esta técnica oferece, como análises rápidas, com baixo consumo de amostra, excelente reprodutibilidade e repetibilidade. No entanto, utiliza grande quantidade de solventes orgânicos, gerando volume elevado de resíduos (GIL, 2010).

Recentemente, as técnicas de separação baseadas na migração eletrocinética, como a eletroforese, complementaram as técnicas cromatográficas, trazendo assim mais uma opção de instrumentação analítica. A EC é a técnica de separação de mais rápida expansão na análise farmacêutica, sendo comparável ao HPLC, em termos de aplicabilidade. A EC é considerada uma "técnica limpa", com consumo ínfimo de solventes e, por consequência, redução de resíduos químicos. Além disso, são suas características a alta seletividade, consumíveis de baixo custo e análises rápidas (WATSON, 2005; RIZVIA et al., 2011; BARDEN et al., 2013).

Na EC, a separação dos analitos baseia-se na migração de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico, ou ainda, na migração de compostos neutros que possam interagir com substâncias que apresentam velocidade de migração diferente do fluxo eletrosmótico (TAVARES, 1996). Esta migração do analito carregado eletricamente ocorre através de um capilar, que é preenchido por eletrólito (GIL, 2010).

A EC tem sofrido um rápido avanço devido à simplicidade instrumental e, principalmente, pela variedade de mecanismos de separação que podem ser efetuados em um único capilar (GIL, 2010). Como métodos de separação, tem-se: eletroforese capilar de zona ou em solução livre; cromatografia eletrocinética micelar ou cromatografia capilar eletrocinética micelar; eletroforese capilar em gel; eletrocromatografia capilar; isotacoforese e focalização isoelétrica capilar (TAVARES, 1997; SILVA, 2007).

A cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) é um modo de separação cromatográfica do EC sem modificações instrumentais, utilizado para a separação de pequenas moléculas neutras, tais como compostos insolúveis em água, que não podem ser separados por

eletroforese capilar de zona (CZE), técnica mais simples do EC. O método de separação por cromatografia eletrocínética micelar é baseado na solubilização micelar e migração eletrocínética, a qual é realizada através da adição de um tensoativo iônico na solução eletrolítica em uma concentração maior do que a concentração micelar crítica. O mecanismo de separação baseia-se na partição do analito entre a fase micelar e a solução eletrolítica, assim, a fase micelar é chamada pseudo-estacionária, pois corresponde à fase estacionária da cromatografia convencional (TAVARES, 1997; KIM et al., 2001; TERABE, 2010).

Para o guia de validação de métodos analíticos (ICH, 2005), validar um procedimento analítico é demonstrar que o mesmo é adequado para a análise pretendida. Segundo a USP 39 (2016) a validação é um processo no qual se estabelece, através de estudos de laboratório, que as características de desempenho do método satisfazem as exigências para a aplicação analítica pretendida. De acordo com a Resolução nº 166 da ANVISA, a validação deve garantir, mediante estudos experimentais, que o método atenda às exigências analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados, apresentando especificidade, linearidade, exatidão, intervalo, precisão, sensibilidade e limite de quantificação, de modo que sejam adequados à análise. Esta resolução ainda ressalta que, para a garantia da qualidade analítica, os equipamentos utilizados na validação devem estar calibrados e os analistas devem ser treinados e qualificados (BRASIL, 2017). De acordo com esses guias, os métodos são classificados em categorias, de acordo com sua finalidade (Quadro 3.2).

Quadro 3.2. Classificação dos testes e sua finalidade

<b>Categoria</b>	<b>Finalidade</b>
<b>I</b>	Métodos quantitativos para análise de substâncias ativas em produtos farmacêuticos
<b>II</b>	Métodos quantitativos ou ensaio-limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação
<b>III</b>	Testes de performance (ex: liberação do ativo, dissolução)
<b>IV</b>	Métodos de identificação

(BRASIL, 2017; ICH, 2005; USP 39, 2016)

Os parâmetros que devem ser avaliados nos estudos de validação são definidos de acordo com a categoria e respectiva finalidade (Quadro 3.3). Para validar um método indicativo de estabilidade, o teste de degradação forçada deve ser realizado sob uma ampla variedade de condições de estresse, a fim de que sejam obtidos produtos de degradação. De acordo com a

RDC nº 53 de 2015, a amostra deve ser submetida a condições como: aquecimento, umidade, solução ácida, solução básica, solução oxidante, exposição fotolítica e íons metálicos. A degradação deve ser suficiente a fim de permitir uma avaliação dos produtos de degradação formados, a qual deve ser superior a 10% e inferior àquela que levaria a degradação completa da amostra. Essa resolução também estabelece parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias sintéticas e semissintéticas (BRASIL, 2015).

Quadro 3.3. Ensaio necessários para validação do método analítico, segundo sua finalidade

Parâmetro	Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
Especificidade	Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	*	Não
Precisão Repetibilidade Intermediária	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	**	**	Não	**	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	*	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão	Sim	Sim	*	*	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

(BRASIL, 2017; ICH, 2005; USP 39, 2016)

\*pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico; \*\*se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da precisão

### 3.4 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

Ao requerer o registro de um medicamento, a indústria deve encaminhar aos órgãos regulatórios a documentação oriunda dos estudos de estabilidade de longa duração e acelerado; após a comprovação do prazo de validade provisório, deve ainda realizar o estudo de estabilidade de acompanhamento. Esses testes devem ser realizados na embalagem e nas condições ambientais previstas para o armazenamento (RE nº 1/2005) e têm por finalidade determinar o prazo de validade dos medicamentos e matérias-primas (BRASIL, 2005).

Por sua vez, os estudos de degradação forçada são usados tanto para determinar a especificidade dos métodos analíticos, quanto para orientar o desenvolvimento de formulações, uma vez que podem indicar susceptibilidade do fármaco à hidrólise, oxidação, fotólise, termólise, entre outros (BAKSHI, 2002; ICH, 2005; BRASIL, 2017).

Reações de degradação nos medicamentos ocorrem em velocidades definidas e dependem de várias condições, tais como fatores intrínsecos à estrutura molecular,

concentração dos reagentes, temperatura, pH, presença de catalizadores, tampões, aditivos, excipientes, contaminação microbiana, além de fatores ambientais como temperatura, umidade e radiações (LACHMAN et al., 2001; YOSHIOKA; STELLA, 2002). Experimentalmente, pode-se monitorar a velocidade de decomposição de um fármaco pelo decréscimo de sua concentração com o tempo ou, alternativamente, pela dosagem de seus produtos de degradação (ATTWOOD, 2003). Para o estudo da cinética de uma reação química é importante a determinação da ordem da reação, que por sua vez, é obtida através da plotagem dos valores de concentração *versus* tempo em cada gráfico específico das reações. As reações são classificadas como ordem zero, primeira ou segunda ordem, as quais são definidas matematicamente por equações (Quadro 3.4). Reação de ordem zero é a reação na qual a velocidade da reação é independente da concentração dos reagentes, isto é, a velocidade é constante; na reação de primeira ordem, a velocidade total da reação é determinada por um termo de concentração; e na reação de segunda ordem, a velocidade da reação depende da colisão de duas moléculas, e a probabilidade dessa colisão, depende da concentração de cada molécula envolvida na reação (LACHMAN et al., 2001; YOSHIOKA; STELLA, 2002).

Pelo conhecimento da ordem de reação, é possível calcular a constante de degradação ( $k$ ) na condição estudada e o tempo em que a concentração é igual a 90% ( $t_{90\%}$ ), usualmente citado como prazo de validade das formulações. Além disso, é possível determinar os valores da constante de degradação e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) na condição estudada, de acordo com as equações para reação, conforme descritas no quadro 3.4 (YOSHIOKA; STELLA, 2002).

Quadro 3.4. Equações das reações de degradação

$k = (C - C_0)/t$	$t_{90\%} = (0,1 \cdot C_0)/k$	Reação de ordem zero	Equação (1)
$k = 1/t \times \ln C/\ln C_0$	$t_{90\%} = 0,106/k$	Reação de primeira ordem	Equação (2)
$k = 1/t (1/C - 1/C_0)$	$t_{90\%} = 1/9 k \cdot C_0$	Reação de segunda ordem	Equação (3)

Legenda:  $k$ : constante de degradação;  $t_{90\%}$ : tempo necessário para que ocorra a decomposição de 10% da substância ativa;  $C_0$ : concentração inicial;  $C$ : concentração em um dado tempo.

### 3.5 ENSAIO DE DISSOLUÇÃO

O teste de dissolução é um teste usado pelas farmacopeias com o objetivo de avaliar, *in vitro*, a liberação imediata de um fármaco a partir de formas farmacêuticas sólidas ou semi-sólidas, incluindo comprimidos e cápsulas de liberação imediata/sustentada (USP 39, 2016). Este ensaio é utilizado em controle de qualidade, com o objetivo de garantir a qualidade lote a lote e também detectar desvios de fabricação, ou seja, demonstrar que as formas farmacêuticas foram fabricadas de acordo com as especificações, assegurando a uniformidade da qualidade



do medicamento, resultando em um produto consistente. Além disso, este teste é utilizado na pesquisa e desenvolvimento, buscando fornecer estimativas preditivas da liberação do fármaco em relação ao desempenho *in vivo* de um produto farmacêutico (FDA, 1997; AZARMI et al., 2007).

O método de dissolução busca avaliar a quantidade de fármaco dissolvido, em um determinado volume de meio, mantido à temperatura de  $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$ , utilizando equipamento com dispositivos (aparatos) para promover agitação do meio, em determinada velocidade (FDA, 2015). Os meios mais comumente utilizados são o ácido clorídrico diluído, soluções tampões na faixa de pH fisiológico (1,2 a 7,5), água e soluções de tensoativos (polissorbatos 80, laurilsulfato de sódio). Para ensaios de rotina, a escolha do meio ideal deve estar relacionada com a estabilidade do fármaco no meio e relevância do desempenho *in vivo-in vitro*, quando possível. Além disso, a determinação do pH antes e após a realização do método pode ser útil na escolha do meio (AZARMI et al., 2007).

Para o ensaio de dissolução existem diferentes aparatos que são utilizados durante o método, sendo que os mais utilizados consistem nos aparatos I (cestas) e II (pás) (USP 39, 2016). O método com aparato pás é o mais utilizado para formas farmacêuticas sólidas, tais como comprimidos ou cápsulas, e a velocidade de agitação geralmente utilizada é de 50 ou 75 rpm. O método com aparato cesta também é utilizado para formas farmacêuticas sólidas, porém aplicando uma velocidade maior de agitação, usualmente 50 a 100 rpm. Para ambos os aparatos, o volume a ser utilizado pode ser em média de 500 a 1000 mL, sendo que o volume mais comum é de 900 mL. Um perfil de dissolução adequado, apresenta 100% de liberação do fármaco entre 45 e 60 minutos (BROWN, 2004; FORTUNATO, 2005; USP 39, 2016).

Após a administração oral, a absorção de um fármaco de uma forma farmacêutica sólida depende da liberação dessa substância a partir do produto farmacêutico, da dissolução e da solubilização do fármaco sob condições fisiológicas e da permeabilidade através do trato gastrointestinal. Devido à natureza crítica da liberação do fármaco, a dissolução *in vitro* pode ser relevante para posterior desempenho *in vivo* (FDA, 1997; TASKEEN; TIRUNAGARI; QURESHI, 2017).

O Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), que considera a solubilidade e a permeabilidade dos fármacos, pode ser utilizado no desenvolvimento do método de dissolução e verificação da possibilidade de realização de correlação *in vitro-in vivo*. De acordo com o SCB, os fármacos podem ser classificados em quatro classes (FDA, 2015):

- Classe 1: Alta solubilidade - alta permeabilidade
- Classe 2: Baixa solubilidade - alta permeabilidade

- Classe 3: Alta solubilidade - baixa permeabilidade
- Classe 4: Baixa solubilidade - baixa permeabilidade

A partir dessa classificação, fármacos altamente permeáveis são aqueles que apresentam biodisponibilidade maior do que 90%. Por sua vez, a solubilidade é determinada pela dissolução de uma dose unitária mais elevada em 250 mL de solução tampão com pH entre 1,0 e 7,5 à 37 °C, sendo considerado altamente solúvel quando o resultado, em volume, da relação dose/solubilidade é menor que 250 mL (LINDENBERG et al., 2004).

O SCB é uma ferramenta útil para determinar as condições nas quais a correlação *in vitro-in vivo* (CIVIV) pode ser esperada, assim como no desenvolvimento das especificações do teste *in vitro* (SIRISUTH; EDDINGTON, 2004). Geralmente a CIVIV é obtida quando a dissolução do fármaco é a etapa limitante da absorção *in vivo*, como é o caso dos fármacos da classe 2. Para fármacos com alta solubilidade em água (classificação 1 e 3), onde o processo de dissolução é rápido, a velocidade de absorção é dependente da permeabilidade e do tempo de esvaziamento gástrico, e dessa forma, nenhuma correlação pode ser estabelecida. Já os fármacos da classe 4, isto é, baixa solubilidade e baixa permeabilidade, apresentam problemas na sua biodisponibilidade, ou seja, são fármacos que não são apropriados para preparação de formas farmacêuticas sólidas (FDA, 1997; SIRISUTH; EDDINGTON, 2004). Nos métodos de dissolução, a validação deve abordar parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, estabilidade no meio de dissolução e robustez. Além disso, para determinação das melhores condições, devem ser realizados testes de solubilidade e interferência de filtros (USP 39, 2016).

A partir de levantamentos em bases de dados, não foram reportados métodos de dissolução para análise de empagliflozina em comprimidos. Nesse sentido, a realização desse estudo virá a contribuir para os estudos de equivalência farmacêutica entre lotes.



## 4.1 INTRODUÇÃO

Para a análise de matérias-primas e formas farmacêuticas, é necessária que seja realizada, além da quantificação, a realização de testes de identificação do fármaco. Ensaios de identificação são capazes de verificar se a identidade do fármaco está de acordo com o especificado em sua embalagem (FB 5, 2010). Embora específicos, testes de identificação não são, necessariamente, suficientes para estabelecer identidade absoluta de um fármaco, de modo que outros testes na monografia contribuem para a confirmação da identidade do produto em análise. Entretanto, o não cumprimento dos requisitos de um teste de identificação pode significar erro de rotulagem do material. Ensaios como infravermelho, espectrofotometria com absorção específica e cromatografia a líquido de alta eficiência acoplada a espectrofotometria, são alguns ensaios que podem ser considerados conclusivos e devem ser realizados em complemento ao ensaio do contra-íon, quando aplicável (FB 5, 2010). Por sua vez, reações químicas de identificação, apesar de específicas, só serão suficientes para estabelecer ou confirmar a identidade da substância quando consideradas em conjunto com outros testes e especificações constantes na monografia. Usualmente, é apresentada na monografia a ordem de preferência dos testes de identificação. Quando não constar a ordem, todos os testes de identificação devem ser realizados (FB 5, 2010).

Por se tratar de um fármaco aprovado recentemente, e considerando a ausência de informações farmacopeicas, o objetivo deste estudo foi avaliar qualitativamente a matéria-prima que será utilizada como substância química de referência (SQR) e os comprimidos de empagliflozina, através de ensaios como calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise por espectrofotometria no UV e IV, eletroforese capilar (EC), cromatografia em camada delgada (CCD) e espectrometria de massas, alguns dos quais exemplos de testes de identificação preconizados nas farmacopeias (FB 5, 2010).

## 4.2 DESCRIÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima usada nesse trabalho foi adquirida da empresa TripleBond (Guelph Ontario, Canadá), e apresentou pureza declarada de 99,77%.

### 4.3 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA

Comprimidos revestidos de empagliflozina 25 mg (Boehringer Ingelheim, Alemanha), lote: 506298, fabricado em agosto/2015, com validade até agosto/2018, utilizado para validação do método analítico e ensaios de estabilidade. Para o ensaio de dissolução, foram utilizados dois lotes de comprimidos, respectivamente: 603440 e 702730, válidos até abril/2019 e março/2020, respectivamente. Todas as amostras foram obtidas em farmácias comerciais da cidade de Santa Maria-RS.

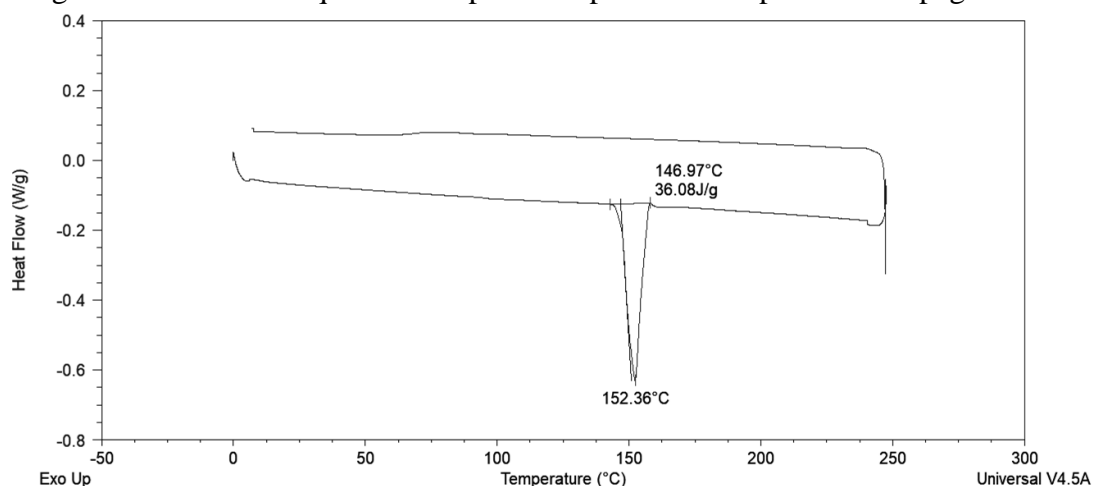
### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA-PRIMA DE EMPAGLIFLOZINA

#### 4.4.1 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Essa técnica fornece informações quantitativas sobre alterações exotérmicas, endotérmicas e de aquecimento como função da temperatura e do tempo, tais como fusão, decomposição, mudança de estrutura cristalina, pureza e temperatura de transição vítrea. Além disso, é uma técnica rápida, que utiliza uma quantidade reduzida de amostra e permite a obtenção das informações para determinação dos parâmetros cinéticos de uma reação (SILVA; MATTOS; NAKAMURA, 2004).

As transições de fase foram obtidas por Calorimetria Exploratória Diferencial de Temperatura Modulada (do Inglês Modulated Temperature Differential Scanning Calorimetry-MTDSC) em um equipamento DSC Q2000 (TA Instruments, USA), equipado com acessório de refrigeração RCS e como gás de purga N<sub>2</sub> (50 mL/min). A taxa de aquecimento utilizada foi 10 °C/min. O instrumento foi inicialmente calibrado no modo DSC padrão, com Índio (99,99%). As massas das panelas e tampas da referência e das amostras pesaram cerca de 51 ± 0,02 mg. As amostras foram fechadas em panelas de alumínio com tampas. As massas das amostras foram pesadas em uma balança Sartorius (M500P) com uma precisão de (± 0,001 mg). Os dados foram tratados utilizando o Software TA Universal Analysis 2000, versão 4.5 (TA Instruments Inc., USA). O equipamento está localizado no Departamento de Química-UFSM. A figura 4.1 apresenta a curva de aquecimento obtida por DSC para empagliflozina.

Figura 4.1. Curva de aquecimento por DSC para matéria-prima de empagliflozina



De acordo com o laudo da matéria-prima da empagliflozina, a temperatura de fusão (152,36 °C) obtida por DSC, está de acordo com o esperado, que é de 148 °C-153 °C. Além disso, foi calculado a pureza da empagliflozina, tendo sido obtido 98,77% de pureza.

#### 4.4.2 Espectrofotometria da região do ultravioleta (UV)

Como prova de identificação, diversas monografias incluem espectros de absorção no ultravioleta (FB 5, 2010), e embora existam limitações com este ensaio, como por exemplo a necessidade da presença de grupamento cromóforo na molécula e baixa seletividade, a espectrofotometria na região do UV é amplamente utilizado como ensaio de identificação (WATSON, 2005). Alguns fármacos requerem o uso de padrões de referência, e as leituras são realizadas simultaneamente entre padrão e amostra, em condições idênticas de comprimento de onda, tamanho da cubeta, solvente e concentração da solução. Muitos solventes são utilizados e apropriados, os quais incluem: água, álcoois, éteres e soluções ácidas e alcalinas diluídas. Contudo, deve-se observar para que os solventes não absorvam na região do espectro em que está sendo utilizada, e para a caracterização o fármaco é dissolvido em solvente apropriado (FB 5, 2010).

A fim de estabelecer os comprimentos de onda de máxima absorção do fármaco, foram realizadas varreduras do fármaco, em diferentes solventes, na faixa de 200-300 nm. A partir de uma solução estoque de 1000 µg/mL, em metanol, realizaram-se diluições em solventes, como: metanol, hidróxido de sódio 0,1 M, ácido clorídrico 0,1 M e água, até concentração de 25 µg/mL. A análise foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV/VIS-1800, equipado com cubetas de 10 mm de caminho óptico.

Em metanol, ácido clorídrico 0,1 M e água observaram-se dois máximos de absorção ( $\lambda_{\text{max}}$ ), 225 nm e 276 nm, assim como não foram evidenciadas diferenças na intensidade de absorção. O espectro em hidróxido de sódio 0,1 M foi diferente dos demais, tendo sido observado deslocamento hipsocrômico do  $\lambda_{\text{max}}$  de 225 nm para 216 nm, o que é sugestivo de modificações moleculares em meio alcalino, tornando esse meio contra-indicado para o preparo de soluções analíticas da empagliflozina. Não foram evidenciados picos de absorção em  $\lambda$  superiores a 300 nm (Figura 4.2). Os espectros obtidos assemelham-se ao reportado por Ayoub (2016) (Figura 4.3), no qual também se evidenciou  $\lambda_{\text{max}}$  em 225 nm.

Figura 4.2. Espectro de absorção na região do UV da empagliflozina, diluída em metanol (—), ácido clorídrico 0,1 M (— --), hidróxido de sódio 0,1 M (—) e água ultrapura (---), na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ .

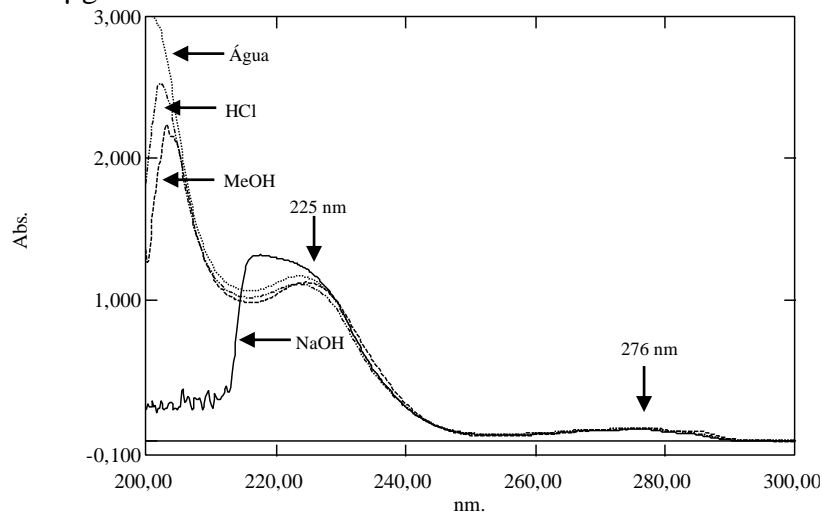
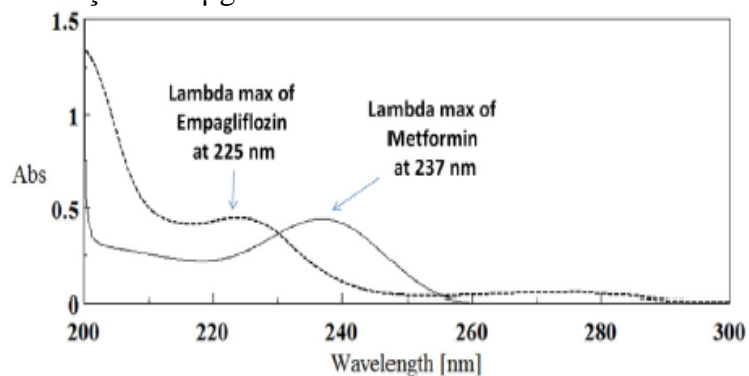


Figura 4.3. Espectro de absorção na região do UV de empagliflozina (Ayoub, 2016), diluída em metanol, na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$ .



#### 4.4.3 Espectrofotometria na região do infravermelho (IV)

A espectrofotometria na região do IV é uma técnica importante na análise qualitativa de compostos orgânicos, sendo amplamente utilizada. Além disso, o infravermelho (IV) constitui um dos recursos para identificação de substâncias orgânicas, e é uma técnica altamente

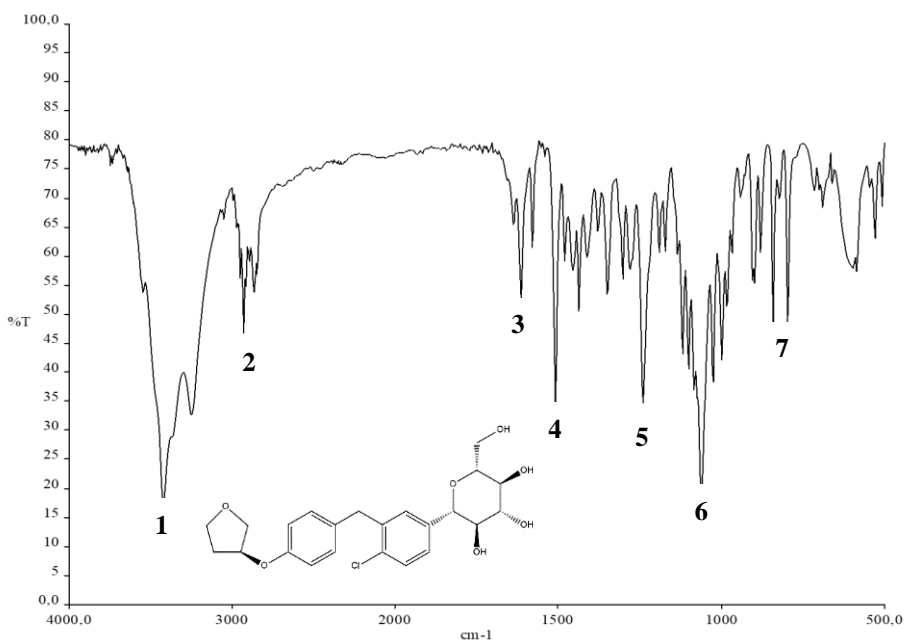
relevante na determinação da pureza e também quantificação de substâncias orgânicas, assim como no controle de reações e processos de separação (LOPES; FASCIO, 2004).

Nessa técnica, as ligações intramoleculares do analito absorvem radiação eletromagnética na faixa de 600 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , causando estiramentos ou deformações. O comprimento de onda da radiação absorvida é característico dos grupos de átomos presentes na molécula e do ambiente químico em que se encontram, de modo não há possibilidade de duas moléculas terem o mesmo espectro de infravermelho. Essa técnica é considerada método de identificação por excelência (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

O espectro de infravermelho da matéria-prima foi obtido através da dispersão de 1,5 mg de empagliflozina em 150 mg de brometo de potássio, seguida de compressão e posterior obtenção de pastilha. Para análise utilizou-se espectrofotômetro FTIR, marca Perkin Elmer, modelo Spectrum One.

Considerando a ausência de um espectro de IV da empagliflozina para comparação, foram consideradas a região de absorção, bem como a intensidade e o formato das bandas do espectro (Figura 4.4). No Quadro 4.4 são destacadas as principais bandas de absorção do fármaco.

Figura 4.4. Espectro da região do infravermelho da empagliflozina SQR





Quadro 4.4. Frequência e atribuição para principais bandas do espectro de IV da empagliflozina

Bandas	Frequência (cm <sup>-1</sup> )	Atribuição
1	3433	Deformação axial de O-H
2	2930	Estiramento C-H de metileno
3	1615	Estiramento C=C de anel
4	1509	Estiramento C=C do anel
5	1242	Estiramento =C-O
6	1063	Deformação axial de C-O-C
7	843 e 792	Deformação fora do plano de anel para-substituído

(NAKANISHI; SOLOMON, 1977)

#### 4.4.4 Espectrometria de massas

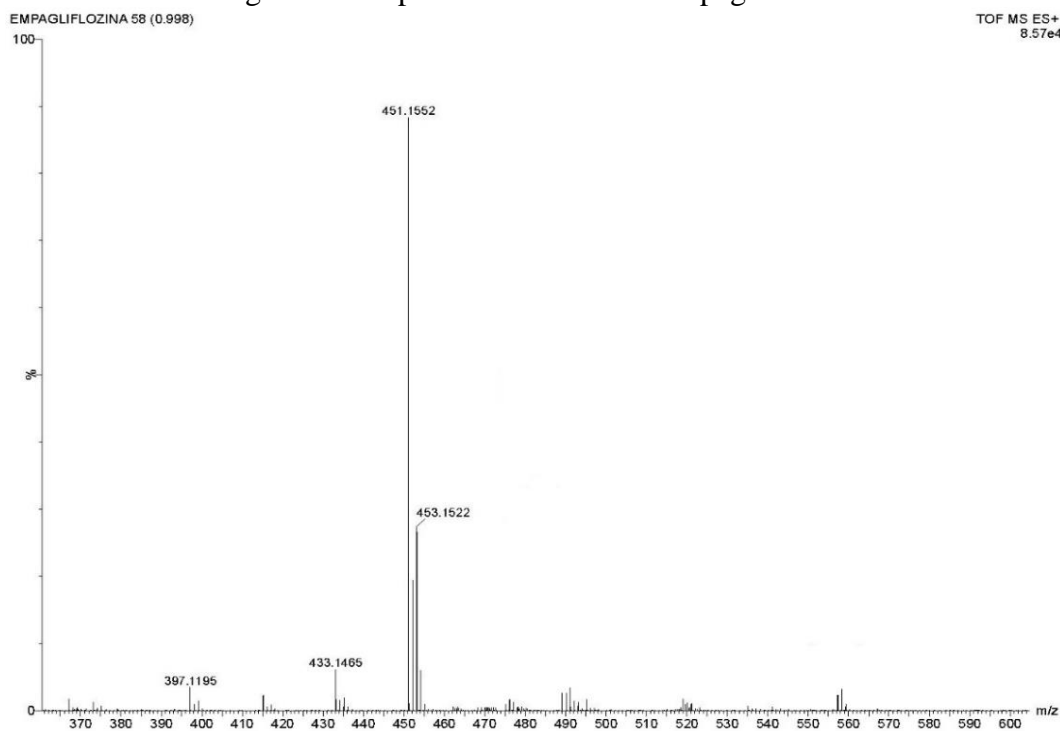
A espectrometria de massas é um método altamente específico para determinar a massa molecular exata de fármacos, e a partir disso, podem-se inferir os elementos constituintes (WATSON, 2005). Os detectores de espectrometria de massas, quando combinados com a cromatografia líquida, são capazes de proporcionar uma alta seletividade, uma vez que picos não resolvidos podem ser isolados monitorando um valor de massa selecionado (FB 5, 2010). Como exemplos, esses detectores podem ser quadrupolo simples, denominados (MS), ou quando associados (MS/MS), e as fontes de ionização mais comumente utilizadas são do tipo: ionização por eletrospray (ESI) e ionização química a pressão atmosférica (FB 5, 2010).

Para as análises por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS), utilizou-se um cromatógrafo a líquido com sistema Acquity UPLC e espectrômetro de massa do tipo quadrupolo e tempo de voo, modelo XEVO G2 Q-TOF (Waters, Milford, MA, EUA). A amostra foi diluída em mistura de acetonitrila e água ultrapura na proporção 1:1, contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico, e analisadas por infusão direta na probe de *electrospray* (ESI) no modo positivo (ESI+). Para aquisição e controle dos dados, utilizou-se o software MassLynx V 4.1. Uma alça de amostragem de 250 µL foi carregada com a amostra e a vazão da infusão foi de 20 µL/min. As condições de ionização foram as seguintes: tensão do capilar: 1,0 kV; tensão do cone de amostragem: 15 V; tensão do cone de extração: 3V; temperatura da fonte: 150 °C; temperatura de dessolvatação: 400 °C; vazão de N<sub>2</sub> no cone de amostragem: 10 L/h; vazão de N<sub>2</sub> da dessolvatação: 500 L/h; faixa de massa monitorada: 50-1000 Da.

A Figura 4.5 mostra o espectro de massas obtido da empagliflozina, no qual pode ser observado o pico do íon molecular da empagliflozina [M+H]<sup>+</sup>, confirmando a massa molecular com m/z 451,1552.

O conjunto de dados confirmou a identidade da matéria-prima, e desse modo, ela passou a ser usada como substância química de referência (SQR) para as etapas subsequentes.

Figura 4.5. Espectro de massas da empagliflozina



## 4.5 ANÁLISE QUALITATIVA DOS COMPRIMIDOS DE EMPAGLIFLOZINA

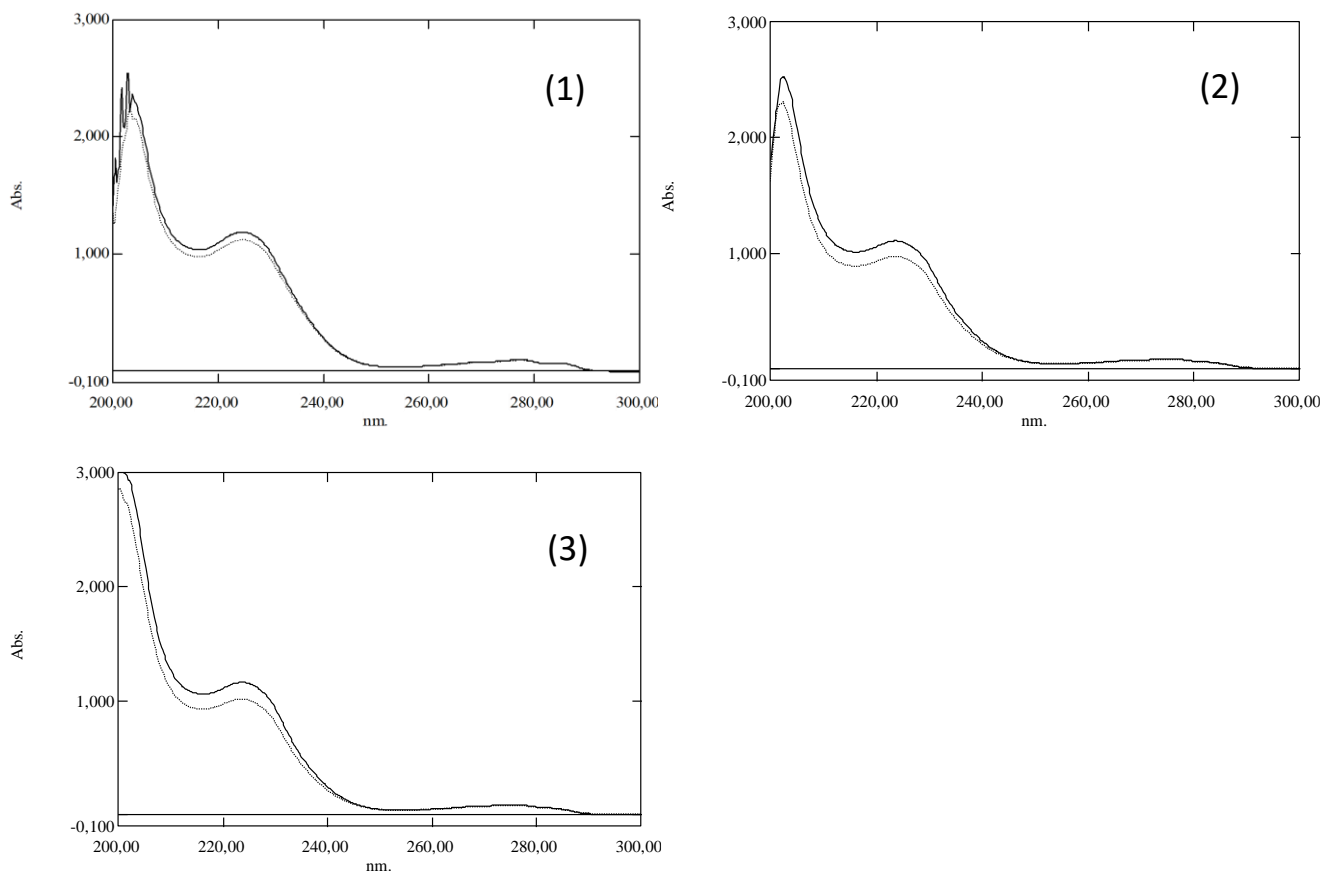
### 4.5.1 Espectrofotometria no ultravioleta

Os espectros na região do ultravioleta da SQR e dos comprimidos de empagliflozina, em diferentes solventes foram sobrepostos, a fim de inferir a presença do fármaco na formulação.

Realizaram-se varreduras do espectro do UV de soluções da SQR e comprimidos de empagliflozina, na concentração de 25 µg/mL, na faixa de 200-300 nm. Para obter esta concentração de análise, a diluição partiu de uma solução estoque de 1000 µg/mL, em metanol. Para fazer a sobreposição dos espectros foram empregados os solventes metanol, ácido clorídrico 0,1 M e água. A análise foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu UV/VIS -1800.

A semelhança entre os espectros da SQR de empagliflozina e dos comprimidos em todos os meios testados (Figura 4.6) indicou a presença de empagliflozina nos comprimidos, assim como a não interferência dos excipientes.

Figura 4.6. Espectro de absorção na região do UV da SQR (—) e amostra (---) de empagliflozina em metanol (1), em ácido (2) e em água (3), na concentração de 25 µg/mL.



#### 4.5.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A CCD é uma técnica de fácil execução e compreensão, versátil, reprodutível e de baixo custo. Este método permite identificar o fármaco quando este é analisado concomitantemente com a substância de referência, bem como, verificar a presença de impurezas e produtos de degradação na amostra (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1990). Até o momento, não há sistemas por CCD descritos para o fármaco.

Foram preparadas soluções estoque na concentração de 1000 µg/mL da SQR, amostra e placebo. A fim de verificar se o sistema cromatográfico seria capaz de diferenciar o analito e seus produtos de degradação, submeteu-se solução da amostra à radiação UVC (254 nm), por 5 horas, condição em que o teor de residual de empagliflozina foi estimado em cerca de 75% (dados experimentais).

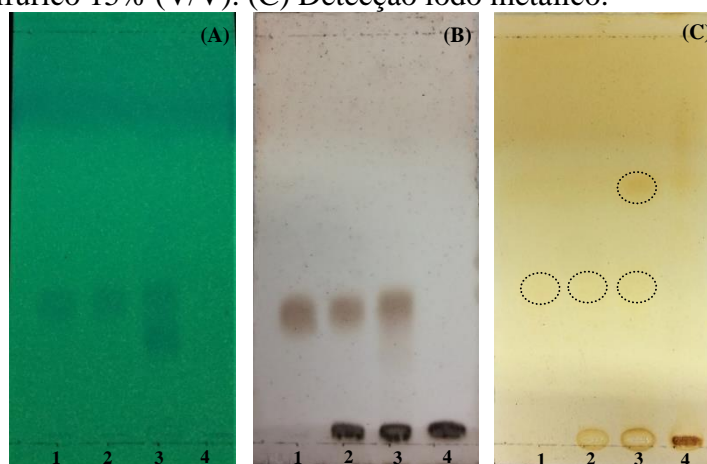
Como fase móvel, empregou-se acetato de etila:metanol (9:1, v/v). Utilizaram-se cromatoplasmas de sílica, medindo 10 cm de comprimento e 5 cm de largura. As placas foram colocadas em cuba saturada, e as manchas foram detectadas através de luz ultravioleta (254

nm) (figura 4.7 **A**), por revelação com ácido sulfúrico 15% (figura 4.7 **B**) e revelação com iodo metálico (figura 4.7 **C**).

Os valores de Rf para SQR, amostra e amostra degradada foram 0,366; 0,355; 0,366, respectivamente (n=3). O valor de Rf para o produto de degradação foi 0,733.

De acordo com os resultados, observou-se que o sistema desenvolvido para análise de CCD foi satisfatório, uma vez que houve a identificação da empagliflozina. Além disso, com a revelação por iodo metálico (figura 4.7 **C**), houve a detecção da mancha do produto de degradação, o qual não foi detectado por UV (figura 4.7 **A**) e ácido sulfúrico (figura 4.7 **C**). Através da revelação por ácido sulfúrico e iodo metálico, observou-se uma mancha intensa no ponto de aplicação da amostra, amostra degradada e solução placebo, o que pode ser atribuído aos excipientes, uma vez que na aplicação da SQR da empagliflozina não houve o aparecimento dessa mancha no ponto de aplicação, em nenhuma das análises realizadas.

Figura 4.7. Placas cromatográficas (CCD). (1) SQR empagliflozina, (2) amostra empagliflozina, (3) amostra degradada em luz UVC (254 nm) durante 5 horas, (4) solução placebo dos excipientes. Fase móvel: acetato de etila:metanol (9:1, v/v). (A) Detecção luz UV. (B) Detecção ácido sulfúrico 15% (V/V). (C) Detecção iodo metálico.



Com a revelação por luz ultravioleta, muitos compostos são passíveis de serem visualizados, por se tornarem fluorescentes quando expostos a essas radiações (comprimentos de onda de 254 nm a 365 nm). Quando as substâncias não são fluorescentes, pode ainda ser utilizado reagentes fluorescentes, e nesse caso observamos manchas escuras em um fundo claro. Ácido sulfúrico é um revelador que necessita de aquecimento posterior à borrifação, na faixa de 100-120 °C, para que ocorra uma reação cromogênica (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1990). A revelação com vapores de iodo é bastante utilizada para compostos orgânicos, e a grande vantagem deste método é que o iodo é rapidamente eliminado da placa, muitas vezes

através do aquecimento da placa. Isso ocorre devido ao iodo se unir apenas às substâncias, exceto em compostos insaturados, aos quais ele pode se adicionar às insaturações (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1990).

#### 4.5.3 Eletroforese capilar (EC)

Eletroforese capilar é composta por diversas técnicas de separação eletrocinéticas, as quais separam os analitos baseando-se, sobretudo, nas diferenças de mobilidade eletroforética, do ponto isoeletrico, do tamanho molecular, da partição entre fases e ainda, na combinação de uma ou mais propriedades (FB 5, 2010). O método de separação por cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), previamente desenvolvido para fins quantitativos, foi usado como forma de identificar a empagliflozina nos comprimidos, pela comparação dos tempos de migração dos picos da SQR e amostra e sobreposição dos espectros de UV, obtido pelo detector de fotodiodos.

As análises foram realizadas através da aplicação do método desenvolvido por MEKC neste trabalho (será apresentado no capítulo 2), utilizando o equipamento Agilent <sup>3D</sup>CE (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), equipado com amostrador automático, detector de fotodiodos, e controlador de temperatura. O software CE ChemStation B.04.03 foi utilizado para aquisição e análise dos dados e as condições utilizadas constam no Quadro 4.5.

Quadro 4.5. Condições utilizadas para identificação da empagliflozina por MEKC

Parâmetros	Condições
Capilar	Capilar de sílica - 40 cm (comprimento efetivo) e 50 µm (d.i)
Temperatura	28 °C
Voltagem	+28 Kv
Injeção hidrodinâmica	4 s - 50 mBar
Deteção	225 nm
Eletrólito de corrida	Tris hidroximetil amino metano 20mM e SDS100 mM, pH 10 (1:1)
Padrão interno	Paracetamol

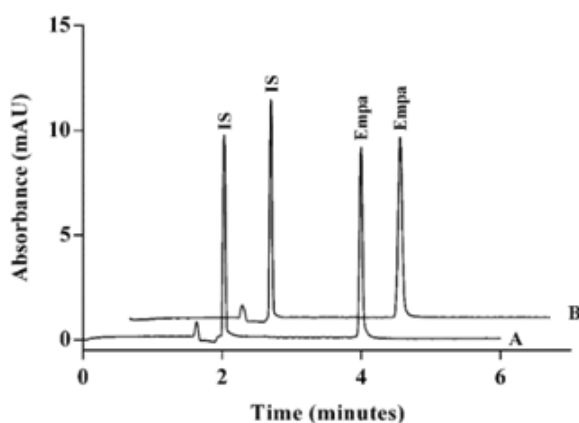
Legenda: d.i: diâmetro interno; SDS: dodecil sulfato de sódio

Para o preparo da solução da SQR, foram pesados exatamente cerca de 10 mg, e dissolveu-se com metanol, obtendo solução estoque 1000 µg/mL. Essa solução foi diluída com água ultrapura, para obter uma concentração de trabalho de 200 µg/mL. A solução estoque de paracetamol (400 µg/mL), utilizada como padrão interno, foi preparada em água ultrapura. Para o preparo da amostra, após determinar o peso médio, pesou-se quantidade do pó dos

comprimidos triturados equivalente a exatamente cerca de 10 mg de empagliflozina. Diluiu-se com metanol, sonicou-se por e após foi levado ao ultrassom por 10 minutos e centrífuga por mais 10 minutos, obtendo uma solução estoque 1000  $\mu\text{g/mL}$ . A partir dessa solução, para obter uma solução 200  $\mu\text{g/mL}$ , diluiu-se em água ultrapura.

Observou-se a sobreposição dos picos da SQR e da amostra, os quais apresentaram tempo de migração de quatro minutos (Figura 4.8). Além disso, houve sobreposição dos espectros de UV, obtidos pelo detector de fotodiodos. Esses dados indicaram que ambos correspondem à mesma substância.

Figura 4.8. Eletroferograma da SQR (A) e amostra (B) de empagliflozina, na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ .



#### 4.6 CONCLUSÕES

- Na análise por DSC, foi possível detectar a temperatura do ponto de fusão, o qual está de acordo com o da literatura;
- Com o espectro da região do UV foi possível fazer a identificação do fármaco, e seus máximos de absorção, sendo que os espectros encontrados foram semelhantes aos encontrados na literatura;
- O espectro de IV mostrou-se estar de acordo com as atribuições esperadas para a molécula de empagliflozina;
- Na análise por espectrometria de massas foi possível fazer a confirmação da massa molecular da empagliflozina;

- A cromatografia em camada delgada permitiu a identificação do fármaco, analisando concomitantemente SQR, amostra e amostra degradada, visto que ainda não há sistemas descritos para o fármaco;
- Através da análise do tempo de retenção e detecção do UV a partir do método desenvolvido por MEKC, foi possível fazer a identificação e confirmação do fármaco.

#### 4.7 REFERÊNCIAS

- AYOUB, B.M. Development and validation of simple spectrophotometric and chemometric methods for simultaneous determination of empagliflozin and metformin: Applied to recently approved pharmaceutical formulation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 168, p. 118-122, 2016.
- COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. 4ª Edição. Revista e ampliada. Campinas: Editora da UNICAMP, 1990.
- FB 5. **Farmacopeia Brasileira, 5ª edição**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa. Vol. 1, 2010.
- LOPES, W.A. & FASCIO, M.; Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.
- NAKANISHI, K.; SOLOMON, P.H. *Infrared Absorption Spectroscopy*. 2ª Edição. San Francisco: Holden-Day, 1977. 287 p.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. Introduction to Spectroscopy: a guide for students of organic chemistry. 3ª edição. South Melbourne: Brooks/Cole, 2001. 579p.
- SILVA, G.; MATTOS, E.C.; NAKAMURA, N.M. Aplicação da calorimetria exploratória diferencial no estudo da cinética de transição  $\alpha \rightarrow \delta$  HMX. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 889-891, 2004.
- WATSON, D.G. Pharmaceutical Analysis. A Textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.





**CAPÍTULO II - ARTIGO I - Empagliflozin determination in tablets by MECK and its application in the degradation kinetic study**

Publicação científica a ser submetida ao periódico “Electrophoresis”

## **Empagliflozin determination in tablets by MECK and its application in the degradation kinetic study**

Pauline Trindade Biscaino<sup>a</sup>; Ana Paula Christ<sup>a</sup>; Daniele Rubert Nogueira-Librelo<sup>a</sup>; Clarice Madalena Bueno Rolim<sup>b</sup>; Andréa Inês Horn Adams<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>b</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Mailing address: Prof. Dr. Andréa Inês Horn Adams. Universidade Federal de Santa Maria - UFSM. Av. Roraima, 1000. Santa Maria/RS - CEP 97105-900. Phone: +55 55 32208661. Fax: +55 55 32208248. E-mail: andrea.i.h.adams@gmail.com

### **Abstract**

The first method by micellar electrokinetic chromatography (MEKC) for the determination of empagliflozin in tablets was developed and validated according to the ICH guidelines. The optimized analytical conditions were separation in a fused silica capillary 50  $\mu\text{m}$  x 40 cm at 28  $^{\circ}\text{C}$ , voltage +28 kV, hydrodynamic injection 4s (50 mBar), detection at 225 nm and paracetamol as internal standard. The running electrolyte was a mixture of 20 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (pH 10) and 100 mM sodium dodecyl sulphate (1:1). The specificity was evaluated by the stress testing and the method was specific, with no interference from the excipients or degradation product. Linearity was observed in the range of 50 to 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ( $r=0.9999$ ). The method showed adequate accuracy (recovery value=100.60%), precision (RSD values <2%) and robustness, which was evaluated by a full factorial design 2<sup>3</sup>. The degradation kinetic of the drug was evaluated under alkaline and acidic conditions and first-order kinetic was observed in both conditions. The cytotoxicity of sample solutions degraded by UVA and UVC radiation, alkaline and acid media were studied as well. A similar cellular viability profile was observed with a slight decrease only in the samples degraded by UVC radiation and basic medium.

**Keywords:** Empagliflozin. Capillary electrophoresis. Validation. Degradation kinetics. Cellular viability.

## 1. Introduction

Empagliflozin (Figure 1) was approved by the FDA in 2014 for the treatment of diabetes mellitus type 2. This drug is a potent and selective inhibitor of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT-2), which is responsible for the glucose reabsorption through glomerular filtration in the kidneys. This way, as a common effect, empagliflozin reduces the renal absorption and decreases the renal threshold for glucose, resulting in an increase in the glucose excretion. In addition, there is a reduction in hyperglycemia, weight and blood pressure [1].

In general, empagliflozin is well tolerated; however, it should be used with caution in patients with moderate to severe renal impairment, since it is metabolized in the renal pathway. Most adverse effects are transient, and include headache, polyuria, thirst with dehydration and hypotension, fungal urogenital infections, especially in women, and urinary tract infection [2,3].

Analytical methods for the determination of empagliflozin in raw material and/or tablets are described and include high performance liquid chromatography (HPLC) [4-7], ultra-high performance liquid chromatography (UPLC) [8-10], ultraviolet (UV) spectrophotometry [11-13] and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) [14].

Although many methods were developed, there are no current monographs for the determination of empagliflozin API and tablets in pharmacopoeias, and methods by capillary electrophoresis (CE) were not reported as well. Electrokinetic migration-based separation techniques, such as electrophoresis, have complemented chromatographic techniques, providing a further option for analytical instrumentation [15-17]. The advantages of this method are: a green method capable of generating extremely small volumes of waste considering other techniques; use of negligible volumes of solvents, which makes it a cheaper technique; easy to operate and handle; fast separation, and lower cost of the capillary compared to HPLC columns [18,17].

CZE is the simplest CE separation mode, applicable to analysis of ionizable molecules; however, MEKC is a CE mechanism of separation, which is used for the separation of neutral molecules, which cannot be separated by (CZE), as water-insoluble compounds [19]. In MEKC, ionic surfactants are added to the running electrolyte at concentrations that provide the formation of micelles, forming a two-phase system (electrolyte and micelles) [20].

This work aimed to develop the first stability indicating MEKC method to assay empagliflozin tablets. Preliminary studies of drug stability were also developed using radiation, temperature, and oxidative, alkaline and acidic media. Besides, it was evaluated the cytotoxicity

of solutions containing empagliflozin and the degradation products got through forced degradation studies.

## 2. Materials and methods

### 2.1 MEKC method development

#### 2.1.1 Chemicals and reagents

Empagliflozin standard (purity 99.77%) was purchased from TripleBond Quality Standards (Canada) and paracetamol, used as internal standard, was purchased from Galena (Brazil). Gardening Jardiance® coated tablets containing 25 mg of empagliflozin (Boehringer Ingelheim, Alemanha) were commercially obtained. Other reagents of reagent grade included: tris(hydroxymethyl)aminomethane (TRIS) (Prokaryms, Brazil), sodium dodecyl sulfate (Neon, Brazil), methanol and sodium hydroxide (Dinâmica, Brazil), hydrogen peroxide and hydrochloric acid (Vetec, Brazil). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Milli Q Gradient System, USA) and was used for all analyses.

In the cytotoxicity study, dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide 2,5-diphenyl (MTT), phosphate buffered saline (PBS) and trypsin-EDTA solution (170,000 U/L trypsin and 0.2 g/L EDTA) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fetal bovine serum (FBS) and Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) with L-glutamine (584 mg/L) and antibiotic/antimicotic (50 mg/mL gentamicin sulfate and 2 mg/L amphotericin B) were purchased from Vitrocell (Campinas, SP, Brazil).

#### 2.1.2 Instrumentation and analytical conditions

Analyses were conducted on an Agilent 7100<sup>3D</sup> CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipped with automatic sampler, photodiode detector and temperature controller. The CE ChemStation B.04.03 software was used for data acquisition and analysis.

MEKC analyses were performed in a fused silica capillary, with 40 cm of effective length (48.5 cm total length) and 50 µm of internal diameter (NST-Nano Separation Technologies) at 28 °C. New capillaries were conditioned for 15 minutes with 1 M NaOH plus 15 minutes in water. At the beginning of each working day, the capillary was sequentially preconditioned for 15 minutes with 0.1 M NaOH, water for 15 minutes and running electrolyte for 15 minutes. In addition, to obtain the reproducibility of the migration time, the capillary was

conditioned among injections, with 0.1 M NaOH for 3 minutes, water for 4 minutes and buffer solution for 5 minutes. After the application of two injections, the running electrolyte was replaced by a new buffer solution to avoid changes in the electroosmotic flow (EOF) and later variations in the area and migration time. The sample was kept at room temperature and the optimized conditions were: hydrodynamic injection of 50 mBar for 4 s; applied voltage +28 kV; detection at 225 nm using photodiode array detector (PDA).

### 2.1.3 Running electrolyte preparation

The running electrolyte was a mixture of buffer and surfactant, which were prepared as the following: the buffer was obtained by dissolving the appropriate amount of TRIS in water to obtain a 20 mM stock solution. Before adjusting the volume, the pH of the buffer solution was adjusted to 10 by the addition of 1 M hydrochloric acid. As surfactant, a 100 mM sodium dodecyl sulphate (SDS) was used. The running electrolyte was prepared with the 1:1 dilution of buffer and surfactant, and the solution was filtered through a 0.22 mm Millex filter (Millipore corp.) before the analysis.

### 2.1.4 Standard and sample solutions preparation

The standard solution was prepared by weighing 10 mg of empagliflozin and dissolving it in methanol to obtain a stock concentration of 1000 µg/mL. This solution was diluted in water to get a 200 µg/mL solution. The paracetamol stock solution (400 µg/mL) was prepared in water and it was used as internal standard (IS).

To prepare the stock sample solution, 20 tablets were weighed to verify the average weight and then they were grinded. A quantity of powdered tablets equivalent to 10 mg of empagliflozin was transferred to 10 mL volumetric flasks. Approximately 5 mL of methanol was added followed by sonication for 10 minutes and then the volume was adjusted with methanol obtaining a 1000 µg/mL stock solution. After 10 minutes of centrifugation, an aliquot was diluted with water to obtain the working concentration of 200 µg/mL.

The standard and sample working solutions were prepared by the mixture of 1 mL of IS solution (paracetamol at 400 µg/mL) and 1 mL of the respective empagliflozin solution (200 µg/mL). The final concentrations were 100 µg/mL (empagliflozin) and 200 µg/mL (paracetamol).

## 2.2 MEKC validation

The proposed method was validated according to the ICH guidelines. The evaluated parameters were: specificity, linearity, precision, accuracy and robustness [21]. A system suitability test was performed according to USP 39 [22].

### 2.2.1 Specificity and forced degradation study

To evaluate the specificity parameter, several stress conditions were applied to the sample solutions (n=2), such as: acid and alkaline hydrolysis, UVA and UVC light, oxidation and temperature. After being exposed to all conditions, the dilutions were prepared in water to obtain empagliflozin at 200 µg/mL. During analysis, the peak purity was verified.

**Acid and alkaline hydrolysis:** the degradations were performed with 2 mL of sample solution (1000 µg/mL) exposed to 1 M HCl for 5 hours or 2 M NaOH for 2 hours to promote acidic and alkaline hydrolysis, respectively. The solutions were kept at room temperature and after exposure; they were neutralized with 1 M NaOH or 1 M HCl as required.

**Oxidation:** 2 mL of sample solution (1000 µg/mL) were exposed to 3% hydrogen peroxide for 10 days (240 hours) to promote oxidation.

**Photostability:** to evaluate the radiation effect, 2 mL of sample solution (1000 µg/mL) were exposed to UVA light (365 nm) for 48 hours and UVC light (254 nm) for 5 hours in a photostability chamber.

**Thermal degradation:** to evaluate the temperature effect, 2 mL of the sample solution (1000 µg/mL) were kept in an oven at 40 °C for 48 hours.

### 2.2.2 Linearity

Linearity was assessed by constructing three analytical curves, each one with five concentrations of empagliflozin standard in the range of 50 to 150 µg/mL (50, 75, 100, 125 and 150 µg/mL), and a fixed concentration of IS (200 µg/mL). The standard curves were obtained by plotting the ratio area (empagliflozin peak area/IS peak area) against empagliflozin concentration. The method of least square regression and analysis of variance was used to determine the MEKC method linearity ( $\alpha=0.05$ ).

The values for LOD and LOQ were calculated according to the USP equations:  $LOD=3.3(\sigma/\alpha)$  and  $LOQ=10(\sigma/\alpha)$ , where  $\sigma$  is the standard deviation of the y-axis intercept and  $\alpha$  corresponds to the mean slope, all obtained from three independent regression lines [22]. The values were expressed as concentration (µg/mL).

### 2.2.3 Accuracy

The method accuracy was evaluated by the addition of the standard solutions to the sample solutions at three levels to obtain the final concentrations of 80, 100 and 120  $\mu\text{g/mL}$ , which correspond to 80, 100 and 120% of the usual analysis concentration. To obtain these solutions, aliquots of 2.5 mL (200  $\mu\text{g/mL}$ ) of sample solution were added to three of 5 mL volumetric flasks and then 0.6, 1.0 or 1.4 mL of standard solution (500  $\mu\text{g/mL}$ ) was added to each flask. Before the analysis, the solutions were diluted with the IS reaching the desired final concentration. Recovery values in the range of  $100 \pm 2\%$  were considered acceptable and the analyses were carried out in triplicate.

### 2.2.4 Precision

Precision was evaluated by repeatability (intra-day analysis) and intermediate precision (inter-day analysis). Sample solutions were prepared as described in section 2.1.4, and repeatability was assessed by the analysis of six independent samples prepared by a single analyst and on the same day. Intermediate precision was assessed by the preparation of other six independent samples on a second day. The relative standard deviation (RSD) was calculated and values  $< 2.0\%$  were considered acceptable [21].

### 2.2.5 Robustness

To evaluate the robustness, a full factorial  $2^3$  design (2 levels and 3 factors) was performed in a random order. Intentional changes were made in the SDS concentration (45 and 55 mM, optimal 50 mM), buffer pH (9.7 and 10.3, optimal 10.0) and voltage (+27 and +29 kV, optimal +28 kV) which were identified as critical parameters to the reproductibility of the method. To carry out this series of planned experiments, standard and sample solutions at the concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$  were used being prepared as described in section 2.1.4. The evaluated response was the empagliflozin assay, calculated by comparison with the standard solution in each condition. All experiments were performed in randomized order to minimize the effects of uncontrolled factors that could bias the response. The experiment design and the results were processed by Minitab®17; the statistical and significance of the effects were evaluated by a Pareto chart.

As part of the robustness study, the stability of the standard solution was determined. Stock solutions were stored in a refrigerator (2 °C to 8 °C) for 10 days. After this period, the aliquots were diluted to the usual working concentration and the results were compared to freshly prepared solutions.

### 2.2.6 System suitability test

The system suitability test was performed to assure the resolution and reproducibility CE system [22]. It was evaluated by the analysis of six repeated injections of the standard solution (100 µg/mL). The factors evaluated were symmetry, theoretical plates, migration time and peak ratio.

### 2.3 Degradation kinetic study

The empagliflozin degradation rate in alkaline and acidic medium was studied as following: 3 mL of 1000 µg/mL empagliflozin solution was added to 3 mL of 1 M sodium hydroxide solution or 1 M hydrochloric acid. After 0, 72, 120, 144 and 192 hours of reaction (0, 3, 5, 6 and 8 days, respectively), the solutions were neutralized as needed, diluted with water to an estimated concentration of 300 µg/mL and the residual content was analyzed by the MEKC method. The kinetic of the degradation reaction was determined by the graphic method, plotting concentration *versus* time (zero order), *ln* of concentration *versus* time (first order), and reciprocal of concentration *versus* time (second order). The correlation coefficient was calculated and the best fit was considered to establish the kinetic order. In addition, the half-life ( $t_{50\%}$ ) was calculated from the value of  $k$ , and time for decomposition of 10% ( $t_{90\%}$ ) [23]. Each degradation condition was evaluated in duplicate.

The drug degradation was also studied under stress conditions in oxidizing medium (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), UVA light (365 nm) and heating (40 °C). Degradation was conducted for 192 hours (oxidizing medium and UVA radiation) and the heating effect was evaluated for 20 and 30 days.

### 2.4 Cytotoxicity study

The cytotoxic effects of non-degraded and degraded empagliflozin samples were evaluated in 3T3 cells (murine Swiss albino fibroblasts) by MTT viability assay, which is a measurement of cell metabolic activity and is based on the first described protocol [24]. The degraded empagliflozin solutions were obtained by the exposure of the sample solutions to 1 mg/mL in the following conditions: alkaline medium (1M NaOH), for 24 and 168 hours; acidic medium (1M HCl), for 24 and 168 hours; UVA radiation (365 nm), for 48 and 168 hours and UVC radiation (254 nm), 2 and 10 hours. After the degradation procedure, the solutions were diluted to reach the theoretical empagliflozin concentration of 25, 10 and 5 µg/mL. Non-degraded samples of different concentrations (25, 10 and 5 µg/mL) were used as control for each respective degraded samples.



The 3T3 cell line was grown in DMEM medium supplemented with 10% FBS (v/v) at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. The cells were routinely cultured in 75 cm<sup>2</sup> culture flasks and harvested using trypsin-EDTA when a confluence of about 80% was reached. Initially, the 3T3 cells were seeded in the central 60 wells of a 96 well plate at a density of 1 x 10<sup>5</sup> cells/mL and incubated for 24 h under 5% CO<sub>2</sub> at 3°C. After this period, the spent medium was replaced by 100 µL of fresh medium supplemented with 5% FBS (v/v) containing the non-degraded or degraded samples. The control cells were treated only with medium (containing 5% FBS, v/v). The cells were exposed to each treatment for 24 h. After, the medium containing the samples was removed followed by the addition of 100 µL of MTT tetrazolium salt (500 µg/mL dissolved in FBS-free medium) to each well. Plates were further incubated for 3 h to allow the formation of purple formazan crystals. Thereafter, these crystals were solubilized by the addition of 100 µL of DMSO to each well followed by the stirring of the plate for 10 min at room temperature. The solutions absorbance was measured at 550 nm in a microplate reader, model SpectraMax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Each sample cytotoxicity was expressed as percentage of viability regarding untreated control cells (the mean optical density of untreated cells was set at 100% viability).

## 2.5 Statistical analysis

The experimental design and the statistical analysis of the robustness test were carried out on Minitab<sup>®</sup> v.17 software (Minitab Inc., State College, PA, EUA) data analysis. Statistical analysis of the cytotoxicity assays were performed using one-way analysis of variance (ANOVA), with SPSS<sup>®</sup> v. 22 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), followed by Dunnett post-hoc analysis.

## 3. Results and discussion

### 3.1 Method optimization

Our first attempt was to develop a separation by capillary electrophoresis (CZE), because it represents the simplest technique used in CE [20]. Three types of buffer solutions (sodium acetate, sodium bicarbonate and boric acid) were tested in different concentrations (10-25 mM) and at different pH values (3.5-10.0). However, in the CZE technique the analyte must be in the ionized form, and because the empagliflozin is a weak acidic drug with pKa 13.23, even at the maximum pH allowed by the technique (pH 11) the molecule was partially ionized making its ionization and detection very difficult.

Thus, a micellar electrokinetic chromatography (MEKC) method was developed because it is an analytical mode capable of separating both neutral and charged molecules [20, 25, 26]. Several conditions were tested with two buffer solutions (boric acid or TRIS in different concentrations (10-30 mM) in a wide pH range (5.5-10), mixed with sodium dodecylsulfate (SDS), tested at two concentrations (80 and 100 mM). In order to define optimal conditions, parameters such as migration time, peak symmetry, area, shape and resolution among the peaks of analyte internal standard were evaluated.

Boric acid, in all the analytical conditions, was associated to high currents, which damaged the capillary. Then, TRIS was used due to the characteristics of being a biological buffer, with large ions of low mobility, which can be used in high concentrations, without causing excessive heat to the capillary, and consequently, not generating high currents to the equipment [27, 20]. It was observed that higher the surfactant concentration was, better was the symmetry of the peaks. In addition, the migration time was shorter as well, what is in accordance with the literature [28, 16]. Organic solvents (methanol or acetonitrile, at 5% or 10% concentration) were added because they can increase the drug solubility providing a shorter migration time [22]. Changes in temperature (25°C-30°C) and voltage (+20 kV to +28 kV) were performed and it was observed that higher values were related to the decrease in the migration time of the analyte and internal standard. Different substances were tested as internal standards to verify the most appropriate for the method. Paracetamol was the chosen one because it is an acidic drug as empagliflozin, with good resolution among peaks and produced a detector response similar to that produced by the analyte.

This way, the test results indicated that the following analytical conditions induced adequate analytical response, which was defined for the analysis of the empagliflozin: running electrolyte composed of 20 mM TRIS buffer, pH 10: 100 mM SDS (1:1 v/v); paracetamol as internal standard; voltage +28 kV, which produced current values between 20 and 22  $\mu$ A; 28 °C temperature; hydrodynamic injection of 4 s (50 mBar) and wavelength detection at 225 nm. Under these conditions, the analyte and internal standard peaks showed adequate symmetry (1.0 and 1.1, respectively), good resolution (17.8) and migration time at about 4 and 2 minutes (empagliflozin and paracetamol, respectively).

## 3.2 Method validation

### 3.2.1 Specificity

Forced degradation assays were performed to evaluate the method's ability to quantify empagliflozin in the presence of excipients and degradation products. Stress testing should result in at least 5-20% degradation and the complete sample degradation should be avoided [29, 30]. Therefore, preliminary tests were performed to define the degradation conditions. Peak purity was evaluated by a PDA detector equipped with CE. Empagliflozin was degraded in alkaline and acidic medium, obtaining residual contents of 80.44% and 84.31%, respectively. However, no additional peaks were observed (electropherograms not shown). Under UVA and UVC radiation, after 48 and 5 hours of exposure, respectively, the residual content was 88.36% and 76.06%, and additional peaks of degradation products were observed (UVA-3.6 minutes and UVC-3.9 and 4.3 minutes) (Figure 1). Under heating, after 48 hours at 40°C, the empagliflozin content decreased to 90.01% without additional degradation peaks (electropherograms not shown). In the oxidizing medium, the degradation was evaluated during 10 days and a residual content around 92.3% was obtained. In all degradation conditions, the empagliflozin peaks had a peak purity index >0.99 what indicated that there was no comigration and consequently, the method was specific.

### 3.2.2 Linearity

The ratio between peak areas *versus* concentration resulted in a linear regression with a correlation coefficient of  $r=0.9999$  and linear equation  $y=0.0165x - 0.0558$ , where  $x$  is the concentration and  $y$  is the area ratio. According to the statistical analysis performed by ANOVA, it showed a significant linear regression ( $p<0.05$ ) and non-significant linear deviation ( $p> 0.05$ ). Therefore, the analytical curve for empagliflozin was considered linear in the range of 50-150  $\mu\text{g/mL}$ .

The calculated LOD was 3.2  $\mu\text{g/mL}$  and the LOQ was 9.6  $\mu\text{g/mL}$  indicating that the developed method has appropriate sensitivity for the intended analysis.

### 3.2.3 Precision

The repeatability (intra-day assay) was evaluated by the analysis of six samples, on the same day and by the same analyst, and mean assay was  $98.63\pm 0.78$  (RSD = 0.79%). The intermediate precision (inter-day assay) was assessed by the analyses of other six independent samples by a different analyst, which showed a mean assay of  $99.08\pm 0.92$  (RSD=0.93%). Both repeatability and intermediate precision levels showed low RSD values (<2%) confirming the good precision of the method. These results also indicated that the mean of the assay

(98.86±0.84, RSD=0.85%, n=12) was in agreement with the label claim for empagliflozin tablets.

#### 3.2.4 Accuracy

The mean recovery was 100.60% with RSD 0.60%, indicating that it was within the established recovery range (98-102%) and confirming the method accuracy (Table 1).

#### 3.2.5 Robustness

The robustness was evaluated by a factorial 2<sup>3</sup> design, in duplicate, in a random order, using the Minitab®17 statistical program. The factors commonly studied in capillary electrophoresis include pH and composition of buffer or running electrolyte, applied voltage, capillary length, temperature and other characteristics [31]. We evaluated the voltage effect, temperature and surfactant concentration because during preliminary tests of the method development they demonstrated great influence on results.

It was observed small variations of empagliflozin assay, as well as in the peak symmetry and migration time. Values of peak symmetry ranged from 1.0 to 1.13; empagliflozin migration time from 3.7 to 4.58, and assay from 99.04% to 100.86%. The significance of the factors was evaluated through Pareto chart (Figure 2), which consists of bars with a proportional length to the absolute value of the estimated effect, divided by the pseudo standard error defined by Lenth (Lenth's PSE) [32]. The codes A, B and C correspond to the evaluated factors, voltage, buffer pH and surfactant concentration. When an interaction among two or more factors occurs, a bar with this combination is indicated. From these results, it was concluded that none of the factors or combinations of factors produced significant changes in the results, indicating the robustness of the developed method.

The stability of the standard stock solution (1000 µg/mL), stored at 2-8 °C, was evaluated by the assay against a freshly prepared solution. The assay of the 10-day-old empagliflozin stored in a refrigerator was 99.6%. However, the assay on the 23<sup>rd</sup> day gave an empagliflozin content of 95.8%, indicating that degradation occurred.

#### 3.2.6 System suitability test

The system suitability was assessed through six repeated injections of the standard solution at a concentration of 100 µg/mL. The parameters evaluated were symmetry, 0.97 (RSD=2.58%), theoretical plates 33143 (RSD=4.87%), migration time 4.33 (RSD=0.98%) and peak ratio 1.62 (RSD=0.88%).

### 3.3 Degradation kinetic study

The stability of empagliflozin solutions was studied observing the following conditions: alkaline, acid and oxidant media, radiation (UVA) and temperature (40 °C). As shown in Figure 3, the degradation is more intense in alkaline and acid media. In these conditions, empagliflozin degradation reached >50% after 8 days of reaction. Data were plotted according to zero, first and second order kinetic, the correlation coefficient was calculated and the closest to the unity was considered to establish the kinetic order [23]. The degradation follows first order kinetics for both conditions tested, since there is a linear relationship between the logarithm of the residual concentration versus time. In alkaline medium it was obtained an  $r=0.9893$  in and  $r=0.9859$  acidic medium. The rate constant order (k) was determined by the graphic equation and the values obtained was 0.004292  $\mu\text{g/mL}$  and 0.004171  $\mu\text{g/mL}$  (alkaline and acidic media, respectively). From this data, the  $t_{90\%}$  (time for 10% decomposition) and the  $t_{50\%}$  (time for 50% decomposition) were calculated. In alkaline condition, the following values  $t_{90\%}=24.7$  h and  $t_{50\%}=161.5$  h were obtained, and in acidic medium the values were  $t_{90\%}=25.4$  h and  $t_{50\%}=166.1$  h.

The exposure to the oxidant medium during 8 days reduced the empagliflozin content to  $93.2 \pm 0.97\%$  and under UVA radiation, the content reduced to  $70.1\% \pm 1.75\%$ . At 40°C the degradation was slower and after 30 days, the empagliflozin content reached  $77.52 \pm 1.73\%$ . In these three conditions the degradation kinetic was not determined, since the drug content did not reached values >50%, which is the recommended value to calculate the degradation parameters [33].

### 3.4 Cytotoxicity

The effect of non-degraded and degraded empagliflozin samples on the cellular viability of 3T3 cells was evaluated by MTT viability assay. The degradation of empagliflozin was achieved by the exposure of the sample solutions to alkaline medium, acidic medium, UVA and UVC radiation. Two reaction times in each degradation procedure were used aiming to obtain different amounts of degradation products. Non-degraded samples at 25, 10 and 5  $\mu\text{g/mL}$  were prepared and used as control for each tested concentration. Figure 4 shows the average cell viability (%).

All the solutions presented a slight cytotoxicity, even the non-degraded samples. Sample solutions exposed for 10 hours to UVC radiation, in the concentration of 25 or 10  $\mu\text{g/mL}$ , decreased the cell viability, as well as the solutions obtained by alkaline hydrolysis, at 10  $\mu\text{g/mL}$  ( $p<0.05$ ). The cell viability was not affected by the solutions containing greater levels of

degradation products, demonstrating that no significant differences were observed between the two exposition times in each condition.

#### 4. Conclusion

The method proposed by MEKC was the first method by capillary electrophoresis developed for the analysis of empagliflozin. The method showed to be specific, linear, precise, accurate and robust, allowing the quantification of empagliflozin, without the interference of excipients or degradation products. The empagliflozin degradation occurred only after several hours of reaction and with the use of strong reagents, suggesting its good stability. The *in vitro* cytotoxicity assay demonstrated that most of the degraded sample solutions induced no cytotoxic effect under the studied conditions.

#### 5. Acknowledgements

The authors thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for the research fellowships.

#### 6. References

- [1] Jojima, T., Tomotsune, T., Lijima, T., Akimoto, K., Suzuki, K., Aso, Y., *Diabetes Metab. Syndr.* 2016, 8(45), 1-11.
- [2] Cersosimo, E., Herrera-Solis, C., Triplitt, C., *J. Brazilian Nephrology* 2014, 36(1), 80-92.
- [3] Milech, A., Oliveira, J.E.P., Vencio, S., *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes*, São Paulo 2016.
- [4] Geetha, P. S., Lakshmana, K.R., Prasad, K.R.S., Suresh, K.B., *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 2016, 9(1), 126-135.
- [5] Ghany-Abdel, M.F., Aziz-Abdel, O., Ayad, M.F., Tadros, M.M., *Acta Chromatogr.* 2017, 29(4), 448-452.
- [6] Padmaja, N., Veerabhadram, G., *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2016, 7(2), 724-727.
- [7] Shyamala, K., Nirmala, J., Mounika, Nandini, B., *Pharm. Lett.* 2016, 8(2), 457-464.
- [8] Ayoub, B.M., *RSC Adv.* 2015, 5, 95703-95709.
- [9] Gopal, N.M., Sridhar, C., *Int. J. App. Pharm.*, 9(3) 2017, 45-50.
- [10] Padmaja, N., Veerabhadram, G., *Oriental Journal of Chemistry* 2017, 33(4), 1949-1958.
- [11] Ayoub, B.M., *Spectrochim. Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2016, 168, 118-122.

- [12] Padmaja, N., Veerabhadram, G., *Pharm. Lett.* 2015, 7(12), 306-312.
- [13] Ayoub, B.M., *J. AOAC Int.* 2017, 100(4), 985-991.
- [14] Ayoub, B.M., Mowaka, S., *J. Chromatogr. Sci.* 2017, 55(7), 742-747.
- [15] Watson, D.G., *Pharmaceutical Analysis*. Edinburgh 2005.
- [16] Rizvia, S. A. A., Dob, D. P., Salehc, A.M., *Eur. J. Chem.* 2011, 2, 276-281.
- [17] Barden, A.T., Piccoli, B.L., Volpato, N.M., Steppe, M., *Anal. Methods* 2013, 5.
- [18] Altria, K.D., *J. Chromatogr. A.* 1999, 856, 443-463.
- [19] Hancu, G., Simon, B., Rusul, A., Mircia, E., Gyéresil, Á., *Adv. Pharm. Bull.* 2013, 3(1), 1-8.
- [20] Tavares, M. F. M., *Quim. Nova* 1997, 20(5), 493-511.
- [21] ICH. Harmonised Tripartite Guideline: Guideline on Validation of Analytical Procedure-Q2 (R1); 2005.
- [22] USP 39. Rockville, United States Pharmacopeial Convention; 2016.
- [23] Yoshioka S., Stella, V. J., *Stability of Drugs and Dosage Forms.*, New York 2002.
- [24] Mosmann, T., *J. Immunol. Methods.* 1983, 65, 55-63.
- [25] Pyell, U., *Electrokinetic Chromatography, Theory, Instrumentation e Applications*, Wiley 2006.
- [26] Terabe, S., *Procedia Chem.* 2010, 2, 2-8.
- [27] Gomori, G., *Methods Enzymol.* 1955, 1, 138-146.
- [28] Vinther, A., Soeberg, H., *J. Chromatogr. Sci.* 1991, 559, 21-42.
- [29] Alsante, K.M., Ando, A., Brown, R., Ensing, J., Hatajik, T.D., Kong, W., Tsuda, Y., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, 59, 29-37.
- [30] Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 53 de 04 de dezembro de 2015.
- [31] Dejaegher, B., Heyden, Y.V., *J. Chromatogr. A.* 2007, 1158, 138-157.
- [32] Lenth, R.V., *Technometrics* 1989, 31(4), 469-473.
- [33] LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. *Teoria e prática na indústria farmacêutica*, Lisboa 2001.

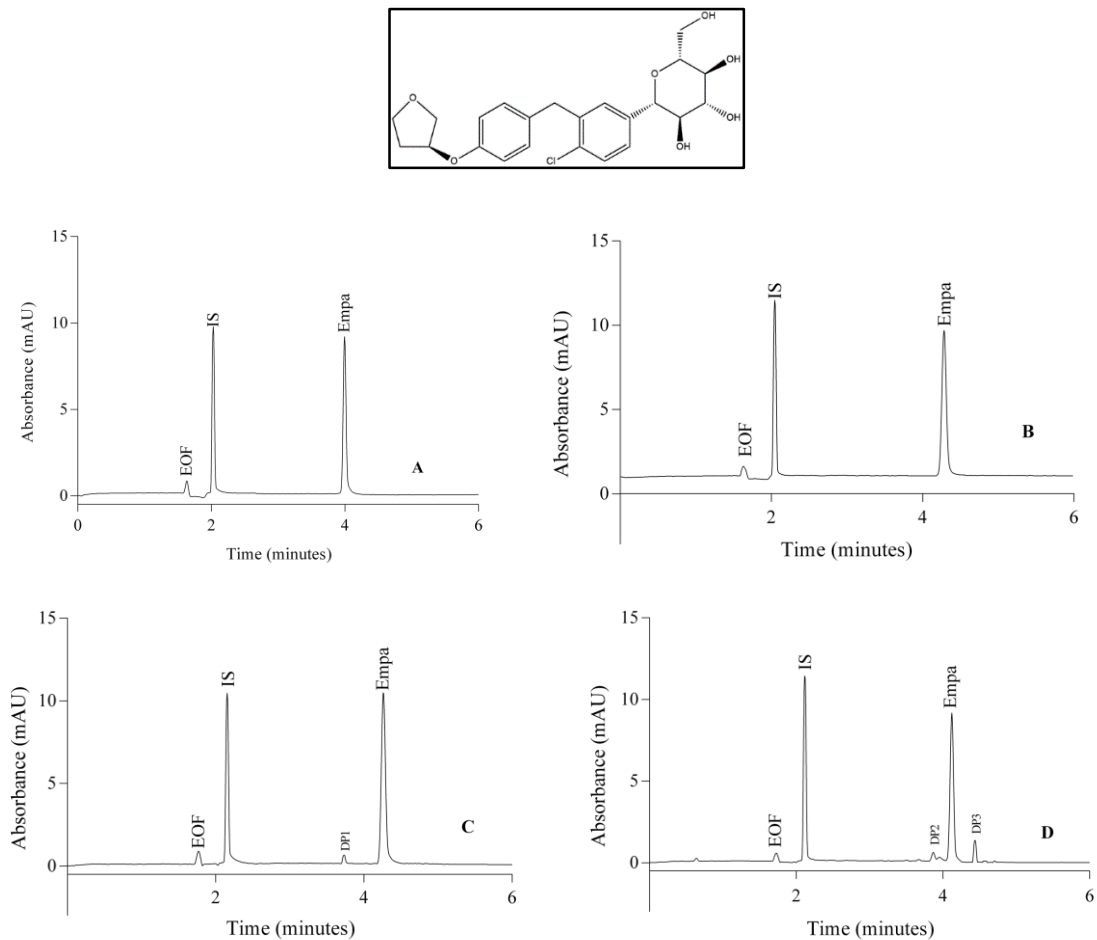
## 7. Figure subtitles

Figure 1: Chemical structure of empagliflozin and electropherograms from empagliflozin solutions exposed to stress testing. (A) empagliflozin standard solution. (B) non-degraded empagliflozin sample solution; (C) empagliflozin sample solution after exposure to UVA light (48 h); (D) empagliflozin sample solution after exposure to UVC light (5 h). EOF: electroosmotic flow; IS: internal standard; DP1: degradation product 1; DP2: degradation product 2; DP3: degradation product 3.

Figure 2: Pareto plot of standardized effects (response is assay;  $\alpha=0.05$ )

Figure 3: Stability of empagliflozin solutions on stress test, evaluated on an 8-day period.

Figure 4: Mean cell viabilities (%) of the degraded samples analyzed in two different times and three concentrations, using 3T3 cells and MTT assay. \*significant response compared to the respective non-degraded sample ( $p<0.05$ ).





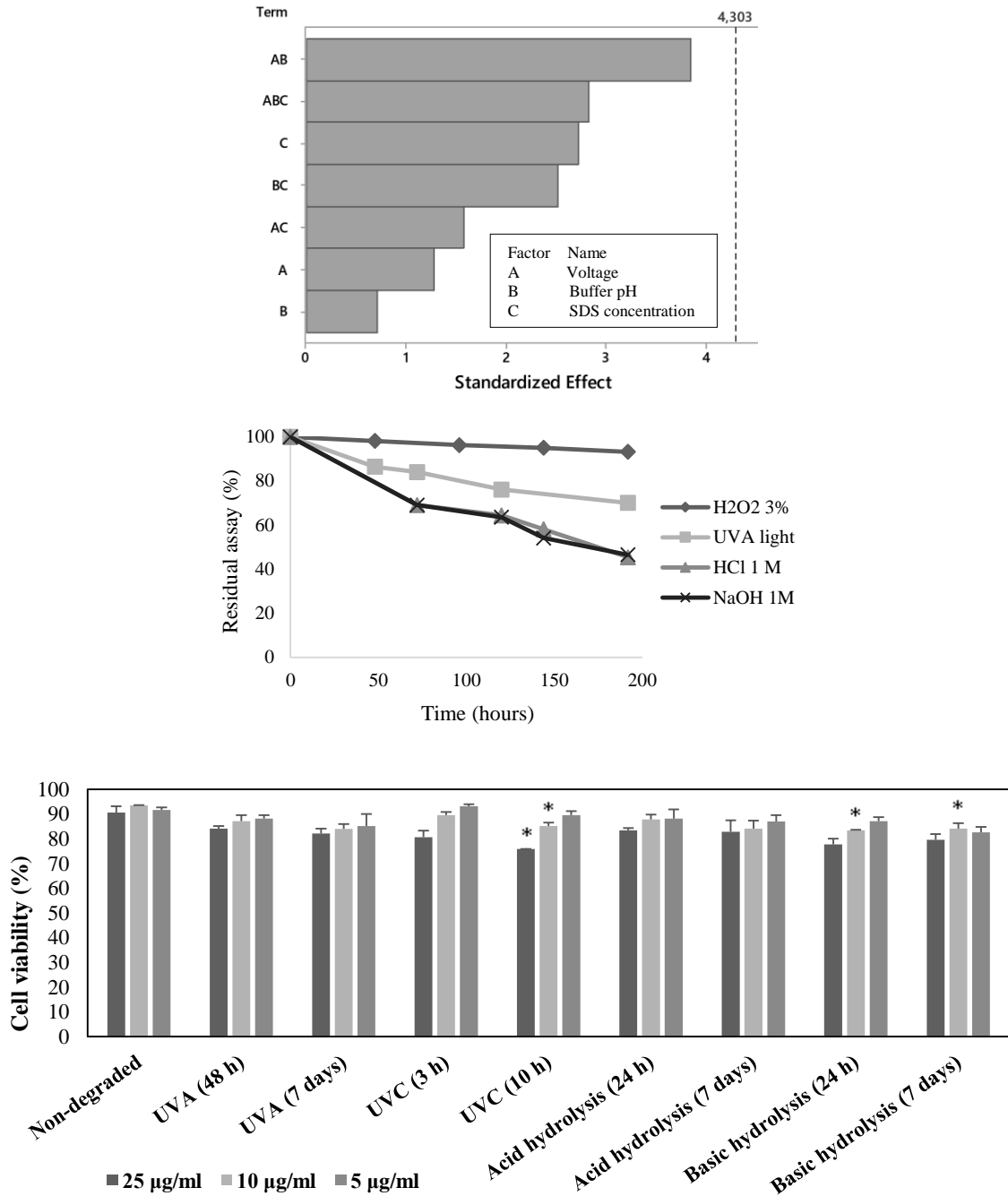


Table 1: Recovery results for the MEKC method

Level (%)	Concentration added (µg/mL)	Concentration recovered ± SD (µg/mL) <sup>a</sup>	Mean recovery (%)	RSD (%)
80	30	30.03±0.09	100.10	0.28
100	50	50.20±0.19	100.40	0.38
120	70	70.91±0.16	101.30	0.23

<sup>a</sup>Mean of three independent analyses



**CAPÍTULO III - ARTIGO II - Development and validation of a spectrophotometric UV dissolution method for empagliflozin tablets**

Publicação científica a ser submetida ao periódico “Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences”

**Development and validation of a spectrophotometric UV dissolution method for empagliflozin tablets**

Pauline Trindade Biscaino<sup>1</sup>; Alieni de Souza<sup>2</sup>; Rebeca Lino<sup>2</sup>; Ana Paula Christ<sup>1</sup>; Andréa Inês Horn Adams<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

Address correspondence to Prof. Dr<sup>a</sup> Andréa Inês Horn Adams. Universidade Federal de Santa Maria – UFSM. Av Roraima, 1000. Santa Maria/RS – CEP 97105-900. Phone: 55 3220 8661. Fax: 55 32208248. E-mail: andrea.ih.adams@gmail.com

**Abstract**

This study aimed to develop and validate the first dissolution method for empagliflozin coated tablets by UV spectrophotometry. After evaluation of the *sink* condition, stability of the drug, dissolution medium and rotation speed, the optimized conditions were obtained and include USP apparatus II (paddles), with rotating speed of 40 rpm, 900 mL of 0.025 M phosphate buffer pH 6.86 medium, at  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ . With these conditions, a dissolution profile with good discriminative power was obtained. The UV-method with detection at 225 nm was validated according to USP 39, by the parameters of specificity, linearity, accuracy and precision and the results obtained indicated the suitability of the procedure. Since there is no official monograph for empagliflozin tablets, the dissolution method developed can be used in the batch-to-batch evaluation, contributing to the quality control of this pharmaceutical product.

**Keywords:** Empagliflozin. Dissolution test. UV spectrophotometry. Coated Tablets.

## INTRODUCTION

*Diabetes mellitus* type 2 (DM2) is a chronic progressive metabolic disease, characterized by hyperglycemia, caused by deficiency of insulin production by pancreatic  $\beta$  cells (Tahara *et al.*, 2017). Empagliflozin (Figure 1) belongs to the class of sodium-glucose 2 cotransport inhibitors, and due to this action mechanism, decreases glucose reabsorption in the proximal tubule and increases the glucose excretion via urine (GUPTTE; UMBARKAR; LAL, 2017). It is a recently approved drug used to treat type 2 diabetes mellitus and, in addition to promoting the reduction of hyperglycemia, is able to cause weight loss, reduce blood pressure and decrease cardiovascular death (Sattar *et al.*, 2017; Gupte; Umbarkar; Lal, 2017).

Several analytical methods for the determination of empagliflozin in raw material and/or tablets were reported by HPLC (Geetha *et al.*, 2016; Ghany Abdel *et al.*, 2017; Padmaja; Veerabhadram, 2016; Shyamala *et al.*, 2016), UPLC (Ayoub, 2015; Gopal; Sridhar, 2017; Padmaja; Veerabhadram, 2017), UV spectrophotometry (Ayoub, 2016; Padmaja; Veerabhadram, 2015; Ayoub, 2017) and LC-MS/MS (Ayoub; Mowaka, 2017). However, there are no compendial monographs for evaluation of empagliflozin, both in tablets or in raw substance.

The dissolution test is used for the purpose of evaluating, *in vitro*, the release of a drug from solid or semi-solid dosage forms, including tablets and immediate/sustained release capsules (USP 39, 2016). The importance of this test is based on the fact that the rate and extension of drug absorption depend on its dissolution from the dosage form. The test is used to evaluate the quality and the lot-to-lot product release performance, to detect manufacturing deviations and is an important study in the development of new formulations (Qingxi; Ma; Higgins, 2006; Taskeen; Tirunagari; Qureshi, 2017). According to the biopharmaceutical classification system, empagliflozin is considered a class III drug (Macha *et al.*, 2013).

Considering the lack of compendial monographs, it is important to develop and validate methodologies for analyzing pharmaceutical products containing empagliflozin, and performing the dissolution test will enable the evaluation of the release of the active substance from the formulation and is equally important to ensure reproducibility between batches. Therefore, the objective of this work is to present the first dissolution method for empagliflozin coated tablets, by a simple UV-method, validated by the current guidelines (USP 39, 2016).

## MATERIAL AND METHODS

### Chemicals

Empagliflozin reference substance (purity 99.77%) was purchased from TripleBond (Canada). Jardiance<sup>®</sup> coated tablets (Boehringer Ingelheim of Brazil Chemicals and Pharmaceuticals Ltda.) containing 25 mg of empagliflozin were obtained commercially. The excipients lactose monohydrate, microcrystalline cellulose, hiprolisis, croscarmellose sodium, silicon dioxide, magnesium stearate, hypromellose, titanium dioxide, talc, macrogol and iron (yellow) oxide were obtained from different local distributors. Methanol, sodium hydroxide and monobasic potassium phosphate were purchased from Dinâmica (Brazil) and dibasic sodium phosphate from Neon (Brazil). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Milli Q Gradient System, USA). The 0.025 M phosphate buffer solution pH 6.86 was prepared according to Brazilian Pharmacopeia (FB 5, 2010), and the dissolution media was sonicated for 15 minutes prior to use.

### Instrumentation and analytical conditions

The dissolution test was performed in a multi-bath PharmaTest dissolution system (n=6), according to the general chapters of USP 39. For the absorbance measurements, a UV-VIS Shimadzu spectrophotometer was used (UV-1800), at 225 nm.

For the determination of solubility and *sink* condition, and the stability of the sample solution, a micelar electrokinetic chromatography (MEKC) method, which was previously validated by our group, was used. The analysis was developed in an Agilent <sup>3D</sup>CE instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipped with an automatic sampler, photodiode detector, and temperature controller. CE ChemStation B.04.03 software was used for data acquisition and analysis. The analytical conditions were a fused silica capillary of 40 cm in effective length and 50 µm of internal diameter (NST-Nano Separation Technologies), in a temperature of 28°C, hydrodynamic injection of 50 mBar for 4 s; voltage of +28Kv; detection at 225 nm using photodiode array detector (PDA). All the sample solutions were filtered with a nylon filter (0.45 µm x 13 mm, Allcrom, Brazil) before the assay.

### Determination of *Sink* Conditions

The *sink* conditions of empagliflozin were evaluated in 0.1 M and 0.01 M HCl, 0.05 M acetate buffer pH 4.5, 0.025 M phosphate buffer pH 6.86, 0.5% sodium lauryl sulfate (LSS); and ultrapure water. To evaluate the *sink* condition, an excess of empagliflozin reference

substance was added in a tube containing 1 mL of each medium and shaken for 5 minutes. Then, the solutions were maintained at  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  for 4 hours and shaken every 1 hour/1 minute. After this time, the solutions were filtered and analyzed by the MEKC method.

### **Dissolution Test Conditions**

A screening with dissolution media and agitation apparatus were performed to select the appropriate conditions. The dissolution test was evaluated according to USP 39, using apparatus II (paddles), at 40 rpm. After dissolution optimization, the chosen dissolution medium was 900 mL of phosphate buffer 0.025 M pH 6.86, which was degassed in ultrasonic bath and maintained at  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ . Aliquots of 10 mL were collected manually at 3, 5, 10, 15, 30, 60 and 90 minutes, immediately filtered in a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter and analyzed without subsequently dilution, obtaining the final concentration of 27.77  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As empagliflozin coated tablets are immediate releasing, the earlier time points was used to provide more discriminating power of the method (Paim *et al.*, 2010; USP 39, 2016). The percentage of drug dissolved was determined by UV-spectrophotometry, at 225 nm, using the dissolution medium as blank.

The reference substance solution was prepared by weighing 10 mg of empagliflozin, which was transferred to a 10 mL volumetric flask. Five milliliters of methanol were added, the mixture was sonicated by 10 minutes, and the volume was made up with the same diluent in order to obtain a 1 mg/mL solution. Subsequently, this solution was diluted with the dissolution medium to 27.77  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and filtered in a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter before analysis.

### **Validation of Dissolution Method**

In order to evaluate whether the spectrophotometric method was suitable for the proposed dissolution test, the method was validated according according to USP 39 (2016), evaluating the parameters of stability, specificity, linearity, precision, accuracy and filter suitability, according to USP 39 (2016).

### **Stability of empagliflozin solutions**

The stability of empagliflozin solutions at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , in 0.025M phosphate buffer pH 6.86, was evaluated by the MEKC method, described in section 2.2. Reference substance and sample solutions (n=2 for each solution) were analyzed at 0, 2, 6 and 24 h after preparation and the decrease on peak areas, peak purity and degradation products occurrence were checked.



### **Filter suitability**

The filter evaluation is necessary to determine the possibility of drug adsorption and the ability of the filter in the removal of insoluble excipients that may otherwise cause high background or turbidity (USP 39, 2016). The reference substance solution at 1 mg/mL was prepared as described at section 2.4 and further diluted to 27.77 µg/mL. After dilution, the absorbance between unfiltered and filtered solutions by nylon filter, was compared.

For sample solution, a stock solution was prepared using the equivalent to 10 mg of empagliflozin of the powdered tablets, which was diluted with 5 mL of methanol and sonicated by 10 minutes. Then, the volume was made up to 10 mL with methanol, obtaining a 1 mg/mL solution. Aliquots of this solution were withdrawn, filtered in quantitative filter, diluted to 27.77 µg/mL with 0.025 M phosphate buffer pH 6.86 and then filtered. For a filter to be acceptable for use, the results of the filtered portions need to approach 98-102% of the original concentrations of the unfiltered solutions (USP 39, 2016). Solutions were filtered a 0.45 µm pore size nylon filter (Allcrom, Brazil).

### **Specificity**

A placebo containing the equivalent weight of each excipient in their usual concentration in the empagliflozin tablet was prepared and transferred to separate vessels containing 900 mL of medium (n=3) at 37 °C ± 0.5, and stirred at 150 rpm using paddles, for 1 hour. In the end, 10 mL aliquots of these solutions were collected, filtered with nylon membrane and scanned in the range of 200 to 400 nm. The estimated concentration of the excipients, listed in the “Chemicals” section, was based on the literature (Kibbe, 2000). The interference was calculated by calculating USP 39 (2016):  $100.C (A_P/A_S).(V/L)$ , where *C* is the concentration, in mg/mL, of the standard; *A<sub>P</sub>* and *A<sub>S</sub>* are the absorbances of the placebo and the standard, respectively; *V* is the volume, in mL, of the medium; and *L* is the label claim, in mg. The interference should not exceed 2%.

### **Linearity**

The stock solution of empagliflozin reference substance at 1 mg/mL, prepared in methanol, was diluted to 250 µg/mL with the dissolution medium. From this solution, three independent calibration curves containing empagliflozin at 5, 10, 15, 20, 25 and 35 µg/mL in the dissolution media were prepared and analyzed at 225 nm. The linearity was verified by linear regression analysis, which was calculated by at least square regression method and analysis of variance (ANOVA), in a 5% significance level.

### Accuracy

The accuracy of the method was assessed by the recovery of known amounts of empagliflozin reference substance added to a vessel containing the excipients diluted in the dissolution media. For the assay, a 5 mg/mL solution was prepared, which was weighed 250 mg of empagliflozin and transferred to a 50 mL volumetric flask with methanol. From this solution (5mg/mL) aliquots of 1, 5 and 6 mL, were transferred to vessels containing 900 mL of dissolution medium, pre-heated at  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$  and stirred for 90 minutes at 40 rpm. After that, 10 mL of each vessel were collected, filtered and analyzed by spectrophotometer at 225 nm. Final concentrations were 5.55, 27.77, 33.33  $\mu\text{g/mL}$ , corresponding to 20, 100 and 120% of the nominal assay concentration.

### Precision

Precision was determined by repeatability and intermediate precision. The repeatability was evaluated from the relative standard deviation (RSD %) of the data obtained in the linearity study, through the replicate measurements of empagliflozin reference substance ( $n=6/\text{concentration}$ , 6 concentrations). Intermediate precision was evaluated by the RSD of the percentage of drug dissolved, obtained by the the execution of the dissolution profile in different days by two analysts.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Determination of *Sink* Conditions and Dissolution Conditions

Empagliflozin is an immediate release drug, and the biopharmaceutical classification is class III (high solubility and low permeability). An important step to select the dissolution medium is the determination of the *sink* condition, which is defined as the volume of medium at least three times greater than the required to dissolve the dose of the drug being tested (USP 39, 2016). *Sink* conditions were evaluated with 0.1 M HCl pH 1.3, 0.01 M HCl pH 1.8 , 0.05 M acetate buffer pH 4.5; 0.025 M phosphate buffer pH 6.86; 0.5% sodium lauryl sulfate (LSS) and ultrapure water. *Sink* condition was observed with all the media tested, reaching concentration of empagliflozin higher than 83.33  $\mu\text{g/mL}$ . However, the higher values were obtained with 0.01 M HCl, 0.025 M phosphate buffer pH 6.86 and LSS 0.5%, which were selected to the development of the dissolution test.

Using paddles at 50 rpm and 900 mL of each medium, a fast release of the drug was observed, which was more evident with 0.5% LSS, without discriminative dissolution profile (Figure 2A). In addition, 0.5% LSS was associated to foam and large variability of the results.

Based in these data, the rotation speed was reduced to 40 rpm, the aliquots were withdrawn at 3, 5, 10, 15, 30, 60 and 90 minutes, and the chosen media were 0.01 M HCl and 0.025 M phosphate buffer pH 6.86, aiming to obtain a better discriminative method. The results of these dissolution profiles are presented at Figure 2B, and the percentual values of dissolution are shown in Table I.

It was observed that with 0.01M HCl the total release of the drug was not reached. Thus, based on the dissolution profiles obtained, the 0.025 M phosphate buffer pH 6.86 medium was chosen (900 mL at  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ ). Aiming to define the rotation speed, an additional test was developed comparing 40 and 50 rpm (Figure 3). It was observed that with 50 rpm, 100% of empagliflozin was dissolved in 15 minutes; conversely, with 40 rpm a better discriminative profile was obtained, reaching dissolution values of 85.7% at 15 minutes and 100% at 60 minutes. For immediate release drugs with highly soluble substances (class I and class III), the acceptance criterion is that >85% is dissolved within 15 minutes of assay, and complete release of the drug is normally expected within 60 to 90 minutes (Hermans *et al.*, 2017). Both conditions were observed with the 0.025 M phosphate buffer pH 6.86 and rotation speed of 40 rpm.

### **Validation of the UV dissolution method**

As initial step of the validation, adsorption of empagliflozin onto the filter was evaluated. Our first attempt was to filter the solutions with a qualitative filter, but the excipients were not completely removed and showed interference mainly on the first times points of the dissolution profile. Then, a 0.45  $\mu\text{m}$ -nylon membrane was used and a comparison between unfiltered and filtered solutions showed empagliflozin recovery values of  $99.65\% \pm 0.28$  (reference substance solution) and  $99.47\% \pm 0.13$  (sample solution), indicating that no adsorption occurred.

The stability of the drug in the dissolution medium was evaluated by MEKC, up to 24h. The range for acceptable drug stability in the dissolution medium is 98-102% of the initial value (USP 39, 2016). Empagliflozin content in the dissolution medium was  $98.66\% \pm 0.95$  and  $98.24\% \pm 0.09$  at 24h, for reference substance and tablets, respectively. Also, all the peaks showed purity index near 1.0 and no extra peaks in the electropherograms were evidenced. According to these results, the drug remained stable up to 24 hours exposure to 0.025 M phosphate buffer pH 6.86.

Specificity was evaluated by the placebo analysis (n=3), and the placebo interference was calculated. The obtained value was 1.63%, which met the requirements (<2%) (USP 39, 2016).

Linearity is established by the analysis of solutions at concentrations ranging from the below the lowest expected concentration and above the highest concentration during release (USP 39, 2016). The lowest concentration level of the calibration curve was 5 µg/mL, which is below to the lowest release value of the dissolution profile (44%, correspondent to 12 µg/mL). The method shown to be linear in the concentration range of 5 to 35 µg/mL, with a correlation coefficient of  $r=0.9997$  and the equation  $y=0.0461x + 0.0137$ . Data were evaluated through ANOVA, which showed significant linear regression ( $p<0.05$ ) and non-significant linearity deviation ( $p>0.05$ ).

The accuracy was evaluated by the recovery test, in the concentration range of 20%, 100% and 120% of the theoretical concentration. For each concentration of empagliflozin, three determinations were performed. The mean recovery was 95.89%, with RSD 1.07%. These values are within the range recommended for accuracy, that is 95-105% (USP 39, 2016), confirming the accuracy of the method (Table II).

The precision of the dissolution method was evaluated through repeatability and intermediate precision. Repeatability was measured from the linearity results, and RSD values between 1.73% and 1.98% were obtained, which are in accordance with the recommended value (<2%) (USP 39, 2016). Intermediate precision was evaluated by the dissolution profiles obtained in different days (Table III), and were also considered acceptable, obtaining values of RSD <10% in points with <85% dissolution and <5% in points with > 85% (USP 39, 2016).

## CONCLUSIONS

In this study, a dissolution method for empagliflozin tablets was developed and validated, according to USP 39 (2016). The drug release profiles were evaluated, and the method presented discriminative power in the selected dissolution medium. Final conditions are 900 mL of 0.025 mM phosphate buffer pH 6.86 as dissolution medium, at  $37\pm 0.5^\circ\text{C}$ , with paddles at 40 rpm. The UV method showed to be specific, linear, precise and accurate and then, the proposed dissolution procedure can be used in the routine quality control of empagliflozin tablets.

## Acknowledgements

The authors to thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for research fellowships.

## REFERENCES

- Ayoub BM. UPLC simultaneous determination of empagliflozin, linagliptin and metformin. *Royal Society of Chemistry*. 2015; 5: 95703-95709.
- Ayoub BM. Development and validation of simple spectrophotometric and chemometric methods for simultaneous determination of empagliflozin and metformin: Applied to recently approved pharmaceutical formulation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2016; 168: 118-122.
- Ayoub BM. Green pharmaceutical analysis of drugs coformulated with highly different concentrations using spiking and manipulation of their ratio spectra. *Journal of AOAC international*. 2017;100(4): 985-991.
- Ayoub BM, Mowaka S. LC-MS/MS determination of empagliflozin and metformin. *Journal of chromatographic Science*. 2017; 55(7): 742-747.
- FB 5. Farmacopeia Brasileira, 5ª edição. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Vol. 1. Brasília: Anvisa, 2010.
- Geetha PS, Lakshmana KR, Prasad KRS, Suresh KB. Development and validation of stability indicating reversed phase high-pressure liquid chromatography method for simultaneous estimation of metformin and empagliflozin in bulk and tablet dosage form. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2016; 9(1): 126-135.
- Ghany-Abdel MF, Aziz-Abdel O, Ayad MF, Tadros MM. New LC–UV methods for pharmaceutical analysis of novel anti-diabetic combinations. *Acta Chromatographica*. 2017; 29(4): 448-452.
- Gopal NM, Sridhar C. A validated stability indicating ultra-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of metformin hydrochloride and empagliflozin in bulk drug and tablet dosage form. *International Journal of Applied Pharmaceutics*. 2017; 9(3): 45-50.
- Gupte M, Umbarkar P, Lal H. Mechanistic Insights of Empagliflozin-Mediated Cardiac Benefits: Nearing the Starting Lin. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2017; 31(3): 229-232.
- Hermans A, Abend AM, Kesisoglou F, Flanagan T, Cohen MJ, Diaz DA, *et al.* Approaches for Establishing Clinically Relevant Dissolution Specifications for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. *The AAPS Journal*. 2017; 19(6).
- Kibbe AH. Handbook of Pharmaceutical Excipients. 3ª Edição. Universidade de Michigan. Ann Arbor: American Pharmaceutical Association; 2000. 665 p.

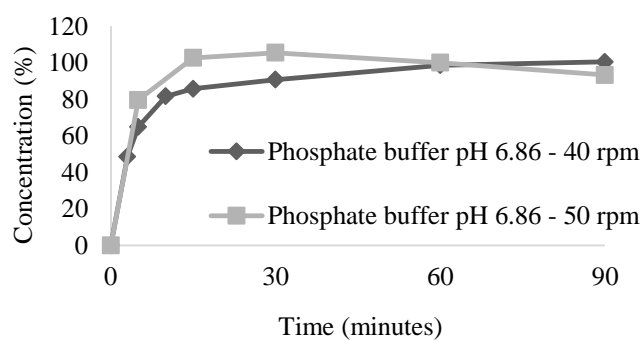
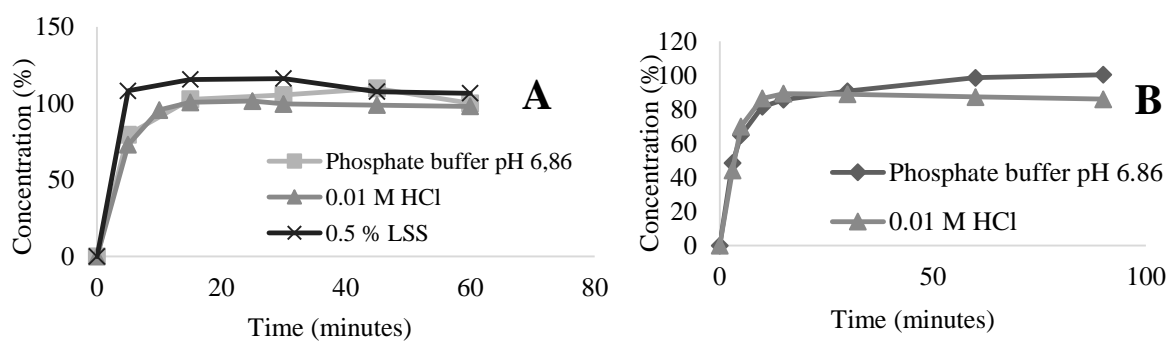
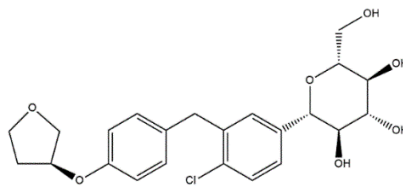
- Macha S, Jungnik A, Hohl K, Hobson D, Salsali A, Woerle HJ. Effect of food on the pharmacokinetics of empagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor, and assessment of dose proportionality in healthy volunteers. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2013; 51(11): 873-879.
- Padmaja N, Veerabhadram G. Development and validation of analytical method for Simultaneous estimation of Empagliflozin and Linagliptin in bulk drugs and combined dosage forms using UV-visible spectroscopy. *Der Pharmacia Lettre*. 2015; 7(12): 306-312.
- Padmaja N, Veerabhadram G. Method development and validation of RP-HPLC method for the estimation of empagliflozin in API. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2016; 7(2): 724-727.
- Padmaja N, Veerabhadram G. A Novel Stability Indicating Rp-Uplc-Dad Method for Determination of Metformin and Empagliflozin in Bulk and Tablet Dosage form. *Oriental Journal of Chemistry*. 2017; 33(4): 1949-1958.
- Paim CS, Martins MT, Malesuik MD, Steppe M. LC Determination of Entacapone in Tablets: In Vitro Dissolution Studies. *Journal of Chromatographic Science*. 2010; 48: 755-759,. 2010.
- Qingxi W, Ma D, Higgins JP. Analytical method selection for drug product dissolution testing. *Dissolution Technologies*. 2006; 8(1): 6-13.
- Sattar N, Petrie MC, Zinman B, Januzzi JL. Novel diabetes drugs and the cardiovascular specialist. *Journal of the american college of cardiology*. 2017; 69(21): 2646-2656, 2017.
- Shyamala K, Nirmala J, Mounika Nandini B. Validated stability-indicating RP-HPLC method for determination of empagliflozin. *Der Pharmacia Lettre*. 2016; 8(2): 457-464.
- Tahara A, Takasu T, Yokono M, Imamura M, Kurosaki E. Characterization and comparison of SGLT2 inhibitors: Part 3. Effects on diabetic complications in type 2 diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*. 2017; 809: 163-171.
- Taskeen M, Tirunagari M, Qureshi HK. Biorelevant and quality control dissolution method development and validation of Quetiapine Fumarate Tablets. *Acta Pharmaceutica Scientia*. 2017; 55(1): 21-37.
- USP 39 Ed. United States Pharmacopeial Convention: Rockville, United States of America, 2016.

## Figure legends

**Figure 1** - Chemical structure of empagliflozin

**Figure 2** - Dissolution profiles of empagliflozin tablets: (A) 0.025 M phosphate buffer pH 6.86, 0.01 M HCl, 0.5% LSS using apparatus II at 50 rpm, in 900 mL medium. (B) 0.025 M phosphate buffer pH 6.86, 0.01 M HCl, using apparatus II at 40 rpm, in 900 mL medium.

**Figure 3** - Dissolution profiles with 0.025 M phosphate buffer pH 6.86 medium, using rotation values of 40 rpm and 50 rpm.



**TABLE I** - Percentual values of the dissolution profiles of empagliflozin tablets 25 mg (n =6), developed in 0.025 M phosphate buffer and 0.01M HCl

Time (min)	0.025 M phosphate buffer pH 6.86 (dissolution %)	RSD	0.01 M HCl (dissolution %)	RSD
3	48.62	5.62	44.20	6.70
5	64.91	5.74	70.02	1.83
10	81.65	7.11	86.55	1.40
15	85.75	7.54	89.36	1.67
30	90.74	7.42	88.98	1.86
60	98.70	4.77	87.34	1.49
90	100.50	5.23	86.03	1.85

**TABLE II** - Results of recovery for the UV method

<b>Level (%)</b>	<b>Concentration added (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>Concentration recovered <math>\pm</math> SD (<math>\mu\text{g/mL}</math>)<sup>a</sup></b>	<b>Mean recovery (%)</b>	<b>RSD (%)</b>
<b>20</b>	5.55	5.38 $\pm$ 0.07	97.00	1.25
<b>100</b>	27.77	26.38 $\pm$ 0.07	95.19	0.26
<b>120</b>	33.33	31.75 $\pm$ 0.16	95.48	0.50

<sup>a</sup>Mean of three independent analysis

**TABLE III** - Intermediate precision results of the dissolution method (n=6/time)

<b>Time (minutes)</b>	<b>Day 1 dissolution (%)<sup>a</sup></b>	<b>Day 2 dissolution (%)<sup>a</sup></b>	<b>RSD (%) between days<sup>b</sup></b>
3	47.88	49.12	1.808
5	69.70	65.78	4.092
10	81.65	82.86	1.040
15	90.96	88.69	1.787
30	96.13	93.54	1.931
60	98.70	96.74	1.418
90	101.45	100.11	0.940

<sup>a</sup>: n=6/time; <sup>b</sup>: n=12/time





## 7. DISCUSSÃO GERAL

A empagliflozina foi aprovada em 2014 pelo FDA como uma nova terapia para o tratamento do DM2. É comercializada em forma de comprimidos de 10 mg e 25 mg, e ainda são inexistentes monografias farmacopeicas deste fármaco tanto como matéria-prima como comprimidos.

Este trabalho foi iniciado pela caracterização da matéria-prima, através dos seguintes testes: calorimetria exploratória diferencial, análises por espectrofotometria no UV e IV e espectrometria de massas. O conjunto de resultados atestou a identidade da matéria-prima, que passou a ser usada como substância química de referência (SQR). Cabe ressaltar que esses dados são inéditos e poderão servir de apoio para estudos posteriores.

Na sequência, foram realizados testes de identificação para os comprimidos de empagliflozina, pelas técnicas de espectrofotometria no UV, eletroforese capilar e CCD. No método espectrofotométrico, buscou-se a análise por solventes aquosos, tendo sido possível resultados adequados pelo uso de HCl 0,1 M, metanol e água como diluentes da solução final. Pela eletroforese capilar, a comparação dos tempos de migração e a sobreposição dos espectros dos picos do padrão e amostra também identificaram a empagliflozina nos comprimidos. Por fim, foi desenvolvido um sistema cromatográfico para análise por CCD, com o uso de diferentes modos de revelação. A revelação com iodo metálico, que foi o mais simples dos reveladores testados, mostrou-se o mais adequado, pois detectou inclusive o produto de degradação da empagliflozina.

Considerando as vantagens já mencionadas da eletroforese capilar, um dos objetivos desse trabalho foi desenvolver e validar o primeiro método por esta técnica, pelo uso da cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), visto que todas as tentativas de desenvolvimento por eletroforese capilar de zona livre (CZE), a técnica mais simples de EC, resultaram sem sucesso. Na MEKC, tensoativos iônicos são adicionados ao eletrólito de corrida, em concentrações que proporcionem a formação de micelas, formando assim um sistema de duas fases (eletrólito e as micelas) (TAVARES, 1997; PYELL, 2006; TERABE, 2010). Nesta modalidade, foram testadas duas soluções tampões associadas ao tensoativo dodecil sulfato de sódio (SDS), em diferentes concentrações e diferentes valores de pH, fazendo mudanças nos parâmetros que o equipamento oferece.

Nesse sentido, mudanças na voltagem refletiram em alterações na corrente do equipamento, sendo que valores altos de voltagem ocasionaram quebra dos capilares. Em relação à temperatura, valores maiores de temperatura propiciaram redução no tempo de

migração, conforme esperado (VINTHER; SOEBERG, 1991). Avaliou-se também a faixa ótima de pH para análise, considerando as características dos tampões usados e o limite do equipamento, que é de no máximo 11,0. O tampão escolhido, tris hidroximetil amino metano, pode ser utilizado em altas concentrações, sem gerar calor excessivo, propriedade que foi relacionada às baixas correntes observadas durante a análise (GOMORI, 1955; TAVARES, 1997), as quais evitaram danos no capilar. Por fim, verificou-se que à medida que a concentração de SDS aumentava, os valores de simetria e tempo de migração melhoravam.

O método por MEKC foi validado (ICH, 2005), conforme demonstrado no **MANUSCRITO I**. As condições otimizadas permitiram a obtenção de picos bem resolvidos, boa simetria e tempo de migração de quatro minutos, com tempo total de análise de seis minutos. Os estudos de degradação forçada indicaram que o método é específico, tendo sido observados picos relativos a produtos de degradação apenas nas condições de fotólise (luz UVA e UVC). Nas outras condições houve apenas redução da área do pico, sem surgimento de picos extras. O método foi linear na faixa de 50-150 µg/mL, exato (percentual de recuperação médio=100,60% ± 0,60), e preciso (valores de DPR < 1,0%). A fim de avaliar a robustez, foram feitas pequenas alterações do processo analítico, na concentração do tensoativo, pH do tampão e voltagem. Observou-se que nenhum fator único ou a combinação de fatores levou a resultados fora dos limites aceitáveis, indicando que o método é robusto para análise de empagliflozina. Além disso, o teste de adequabilidade do sistema foi realizado, a fim de verificar a reprodutibilidade do sistema, a qual se mostrou satisfatório.

Portanto, a partir dos resultados da validação analítica, o primeiro método por eletroforese capilar, através do modo de separação por MEKC, provou ser adequado para análise de comprimidos revestidos empagliflozina.

Nos estudos preliminares de estabilidade, o fármaco foi exposto à hidrólise ácida, hidrólise alcalina, oxidação e fotólise, durante oito dias. Em meio oxidante (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%), o fármaco apresentou degradação abaixo de 10%. Segundo a RDC 53/2015, os estudos de degradação forçada devem promover degradação em nível que permita a avaliação da formação de produtos de degradação, e estabelece que a degradação deva ser superior a 10% e inferior àquela que levaria a degradação completa da amostra. Quando inferior a 10%, a empresa deve apresentar justificativa técnica fundamentada. Além disso, a análise crítica do perfil de degradação deve contemplar a avaliação dos fatores que podem interferir de alguma forma na estabilidade do medicamento (BRASIL, 2015).

Nesse sentido, sugere-se que a empagliflozina é dificilmente oxidada, tendo em vista o longo tempo requerido para obtenção de baixos valores de degradação. Em luz UVA (365 nm,

por oito dias) e aquecimento (40 °C/30 dias), foram obtidas degradações de aproximadamente 30% e 20%, respectivamente, para as soluções obtidas a partir dos comprimidos. Extrapolando para a forma farmacêutica, esperam-se velocidades de degradação ainda menores, caso o produto seja exposto às condições usadas, e, portanto, esses resultados sugerem que não são necessários cuidados em relação a esses fatores de degradação. Por fim, nas condições de hidrólise alcalina e ácida, houve degradação acima de 50% em oito dias de exposição. A partir desses dados, foi avaliada a cinética de degradação do fármaco nesses meios, evidenciada como sendo de primeira ordem, para ambas as condições, com  $t_{90\%}=24,70$  horas (meio alcalino) e  $t_{90\%}=25,40$  horas (meio ácido). Ainda que a exposição a valores de pHs ácidos e alcalinos possa ocorrer fisiologicamente, por se tratar de forma farmacêutica de liberação imediata e ser rapidamente absorvida, não espera-se degradação em condições fisiológicas.

A partir da análise de citotoxicidade do fármaco e das soluções que continham produtos de degradação, observou-se leve citotoxicidade em todas as condições testadas, mostrando diferença significativa apenas entre as concentrações de 25 e 10 µg/mL para algumas condições de degradação.

Na etapa seguinte, foi validado método de dissolução por espectrofotometria no UV. O teste de dissolução é um teste no qual deve haver um poder discriminativo apropriado, a fim de distinguir mudanças que ocorrem em uma composição ou processo de fabricação, que podem afetar no desempenho *in vivo*. Para a indústria farmacêutica, o teste de dissolução é uma ferramenta bastante importante no desenvolvimento de novas formulações, pois é capaz de avaliar a qualidade do medicamento lote a lote (USP 39, 2016; MACHADO et al., 2014). Os resultados dessa etapa são apresentados no **MANUSCRITO II**.

Para a realização do ensaio de dissolução, inicialmente avaliou-se a solubilidade da empagliflozina. Para isso, diferentes meios de dissolução foram utilizados, a fim de verificar a condição *sink*, definida como uma quantidade de solvente não inferior a três vezes o volume de meio necessário para obter uma solução saturada do fármaco (USP 39, 2016). Apesar de ter sido verificado que todos os meios testados proporcionavam condição *sink*, foram selecionados aqueles nos quais a empagliflozina apresentava maior solubilidade, que foram: tampão fosfato pH 6,86, LSS 0,5% e HCl 0,01 M. Os tempos de coletas foram 5, 10, 15, 30, 45 e 60 minutos, com velocidade de rotação 50 rpm, 900 mL de meio, e análise por UV, em 225 nm. Entretanto, na análise dos perfis de dissolução, houve dissolução total do fármaco em 15 minutos, sendo que para o meio LSS 0,5% a liberação total ocorreu em 5 minutos de ensaio, o que impossibilita a obtenção de perfis discriminativos. Com isso, optou-se por reduzir a velocidade de rotação (40 rpm), utilizando os meios tampão fosfato pH 6,86 e HCl 0,01 M. Nessas condições,

observou-se dissolução mais lenta, entretanto, o meio HCl 0,01 M foi descartado, devido a dissolução não atingir 100%. Para fármacos de liberação imediata, com substâncias altamente solúveis (SCB I e III), o critério de aceitação é de  $\geq 85\%$  do fármaco dissolvido em 30 e 15 minutos, respectivamente, sendo que normalmente se espera a dissolução total do fármaco entre 60-90 minutos (HERMANS et al., 2017). Sendo assim, a escolha do meio foi devido a esses critérios, os quais foram obtidos com o uso do tampão fosfato, que apresenta pH próximo ao fisiológico, além de ser um meio de fácil preparação.

As condições otimizadas para o ensaio, foram: 900 mL de meio tampão fosfato pH 6,86, à 37 °C, velocidade de rotação 40 rpm, com coleta de 10 mL em tempos de 3, 5, 10, 15, 30, 60 e 90 minutos, filtração em filtro de nylon com 0,45  $\mu\text{m}$  de poro. Cabe salientar que inicialmente buscou-se a filtração com filtro qualitativo, o que reduziria os custos da análise. No entanto, testes de recuperação da substância química de referência adicionada ao meio contendo placebo, em três concentrações (20, 100 e 120% da concentração teórica), mostraram que em baixas concentrações a não remoção adequada dos excipientes levava a recuperações que ultrapassavam os limites estabelecidos pela USP 39 (2016).

Além dos diferentes materiais filtrantes, avaliou-se também o efeito da centrifugação. Os resultados desses testes constam na Tabela 7.1. Observou-se que os valores só não estavam dentro dos estabelecidos (95-105%) conforme USP 39 (2016), através da filtração com filtro de papel.

**Tabela 7.1.** Resultados da avaliação do método de remoção dos excipientes para as soluções analíticas do teste de dissolução

Método para eliminação de interferentes	Concentração (%)	*Média (% dissolução) $\pm$ DP
Filtração em papel qualitativo <sup>(a)</sup>	20	136,50 $\pm$ 3,66
	100	103,67 $\pm$ 1,88
	120	103,64 $\pm$ 2,69
Filtração em membrana de nylon <sup>(b)</sup>	20	97,00 $\pm$ 1,25
	100	95,19 $\pm$ 0,26
	120	95,48 $\pm$ 0,50
Centrifugação <sup>(c)</sup>	20	97,80 $\pm$ 6,04
	100	96,58 $\pm$ 0,24
	120	98,74 $\pm$ 4,68

\*média de três determinações; (a): 15cm diâmetro e gramatura 80 g/cm<sup>2</sup>; (b): 0,45  $\mu\text{m}$  e 47 mm de diâmetro; (c): 4000 rpm em 10 minutos.

Apesar de estar dentro dos limites, foi descartada a possibilidade do uso da centrifugação, uma vez que com o uso desse procedimento pode ocorrer a continuidade da

dissolução e além disso, pode haver um gradiente de concentração no sobrenadante (USP 39, 2016).

Após a otimização dos parâmetros analíticos, o método de dissolução por espectrofotometria no UV foi validado, conforme a USP 39 (2016). O método mostrou-se específico, não havendo interferência dos excipientes; também foi linear na faixa de 5-35 µg/mL, com coeficiente de correlação  $r=0,9997$ , exato e preciso. Dessa forma, o método de dissolução por espectrofotometria no UV pode ser aplicado para análise dos comprimidos revestidos de empagliflozina, garantindo a qualidade lote a lote e podendo ser utilizado no controle de qualidade dos comprimidos, uma vez que ainda não existe monografia farmacopeica para o fármaco.



## 8. CONCLUSÕES

- Análises de calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectrofotometria no UV e IV e espectrometria de massas, permitiram caracterizar a SQR e confirmar a identidade do fármaco, permitindo encontrar dados que ainda não estão disponíveis na literatura;
- Os métodos de identificação desenvolvidos para a análise dos comprimidos de empagliflozina eletroforese capilar (EC), cromatografia em camada delgada (CCD) e espectrofotometria na região do UV são adequados para a análise qualitativa dos comprimidos;
- O método para quantificação da empagliflozina desenvolvido e validado por eletroforese capilar, através do mecanismo de separação por cromatografia eletrocínica micelar (MEKC), mostrou-se específico, linear, preciso, exato e robusto, podendo ser aplicado para análises de rotina, em análises de estabilidade da empagliflozina e no controle de qualidade dos comprimidos;
- O estudo de degradação forçada, realizado na amostra dos comprimidos de empagliflozina, demonstrou o aparecimento de outros picos adicionais no eletroferograma, indicando produtos de degradação em condições de fotólise (luz UVA e UVC). Para as demais condições de estresse aplicadas (hidrólise alcalina, hidrólise ácida, oxidação, aquecimento) não houve o aparecimento de produtos de degradação, porém, houve uma redução da área do pico da empagliflozina, os quais demonstraram a degradação da amostra, que ocorre apenas após longos períodos de exposição;
- A degradação da empagliflozina, durante oito dias, em meio alcalino e ácido segue cinética de primeira ordem, sendo que nas condições testadas, o t<sub>90%</sub> em ambas as condições é de cerca de 25 horas. A degradação em meio oxidante, luz UVA e aquecimento, houve uma degradação lenta, e a cinética de degradação não foi determinada, uma vez que o conteúdo do fármaco não atingiu valores >50%, que é o recomendado para o cálculo de parâmetros de degradação.
- A análise de citotoxicidade de soluções do fármaco e de soluções contendo produtos de degradação evidenciou leve citotoxicidade em todas as condições e leve decréscimo da viabilidade celular para soluções expostas à radiação UVC e meio alcalino;



- O método de dissolução desenvolvido e validado por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), mostrou-se ser específico, linear na faixa estudada, preciso e exato, podendo ser aplicado para análise dos comprimidos de empagliflozina.



## 9. REFERÊNCIAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 37, n. 1, p. 581-590, 2014.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. 3ª ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2003. 727 p.

AYOUB, B.M. UPLC simultaneous determination of empagliflozin, linagliptin and metformin. **Royal Society of Chemistry**, v. 5, p. 95703-95709, 2015.

AYOUB, B.M. Development and validation of simple spectrophotometric and chemometric methods for simultaneous determination of empagliflozin and metformin: Applied to recently approved pharmaceutical formulation. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 168, p. 118-122, 2016.

AYOUB, B.M. Green pharmaceutical analysis of drugs coformulated with highly different concentrations using spiking and manipulation of their ratio spectra. **Journal of AOAC international**, v. 100, n. 4, p. 985-991, 2017.

AYOUB, B.M., MOWAKA, S. LC-MS/MS determination of empagliflozin and metformin. **Journal of chromatographic Science**, v. 55, n. 7, p. 742-747, 2017.

AZARMI, S.; ROA, W.; LÖBENBERG, R. Current perspectives in dissolution testing of conventional and novel dosage forms. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 12-21, 2007.

BARDEN, A.T., PICCOLI, B.L., VOLPATO, N.M., STEPPE, M. A simultaneous assay method using capillary zone electrophoresis for a fixed dose combination of vildagliptin and metformin hydrochloride in coated tablets. **Analytical Methods**, v. 5, p. 1-8, 2013.

BAKSHI, M.; SINGH, S. Development of validated stability-indicating assay methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, p. 1011-1040, 2002.

BERTOLDI, A.D.; KANAVOS, P.; FRANÇA, G.V.A.; CARRARO, A.; AUGUSTO, C.; TEJADA, O.; HALLAL, P.C.; FERRARIO, A.; SCHMIDT, M.I. Epidemiology, management, complications and costs associated with type 2 diabetes in Brazil: a comprehensive literature review. **Global Health**, v. 9, n. 62, 2013.

BORON, W.F.; BOULPAEP, E.L. **Fisiologia médica. Fisiologia celular e molecular**. Capítulo 5 - transporte de solutos e água. 2ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier editora Ltda, 2015. 125 p.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 166, 24 de julho de 2017. **Guia para validação de métodos analíticos**. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 25 de julho de 2017.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de vigilância sanitária. Histórico da elaboração da Resolução - Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005. **Guia para realização de**

**Estudos de Estabilidade.** D.O.U. – Diário Oficial da União; Poder executivo, 29 de julho de 2005.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RDC nº 53 de 04 de dezembro de 2015. **Parâmetros para notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências.** DOU-Diário Oficial da União; Poder executivo, 04 de dezembro de 2015.

BROWN, C.K.; CHOKSHI, H.P.; NICKERSON, B.; REED, R.A.; ROHRS, B.R. SHAH, P.A. Acceptable Analytical Practices for Dissolution Testing of Poorly Soluble Compounds. **Pharmaceutical Technology**, p. 56-65, 2004.

BURGGRAAF, B.; CABEZAS, M.C. Interventions in type 2 diabetes mellitus and cardiovascular mortality—An overview of clinical trials. **European Journal of Internal Medicine**, v. 42, p. 1-15, 2017.

CERSOSIMO, E.; HERRERA-SOLIS, C.; TRIPLITT, C. Inhibition of renal glucose reabsorption as a novel treatment for diabetes patients. **Brazilian Journal Nephrology**, v. 36, n. 1, p. 80-92, 2014.

CONCEIÇÃO, R.A.; SILVA, P.N.; BARBOSA, M. L. C. Fármacos para o tratamento do diabetes tipo II: uma visita ao passado e um olhar para o futuro. **Revista Virtual Quim.**, v. 9, n. 2, p. 514-534, 2017.

DALAMA, B.; MESA, J. New Oral Hypoglycemic Agents and Cardiovascular Risk. Crossing the Metabolic Border. **Revista Espanhola de Cardiologia**, v. 69, n. 11, p. 1088-1097, 2016.

DRUGBANK. Empagliflozina. Disponível em: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB09038>. Acesso em 28 de Agosto de 2017.

FDA. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. **Center for Drug Evaluation and Research (CDER)**, August, 1997.

FDA. Guidance for Industry: Dissolution Testing and Specification Criteria for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Containing Biopharmaceutics Classification System Class 1 and 3 Drugs. Center for Drug Evaluation and Research (CDER). **Biopharmaceutics**, August, 2015.

FIGUEIREDO, D.M.; RABELO, F.L.A. Diabetes insipidus: main aspects and comparative analysis with diabetes mellitus. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 30, n. 2, p. 155-162, 2009.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, v. 93, p. 137-188, 2013.

FORTUNATO, D. Dissolution Method Development for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. “Quick Start Guidelines for Early Phase Development Compounds”. **Dissolution Technologies**, p. 12-14, 2005.

GAEDE, P.; LUN-ANDERSWN, H; PARVING, H.; PEDERSEN, O. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. **New England Journal of Medicine**, v. 358, p. 580-591, 2008.

GALLWITZ, B. A safety evaluation of empagliflozin plus linagliptin for treating type 2 diabetes. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 16, n. 12, p. 1399-1405, 2017.

GEETHA, P. S.; LAKSHMANA, K.R.; PRASAD, K.R.S.; SURESH, K.B. Development and validation of stability indicating reversed phase high-pressure liquid chromatography method for simultaneous estimation of metformin and empagliflozin in bulk and tablet dosage form. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 9, n. 1, p. 126-135, 2016.

GERICH, J.E. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. Journal compilation Diabeter UK. **Diabetic Medicine**, n. 27, p. 136-142, 2010.

GHANY-ABDEL, M.F.; AZIZ-ABDEL, O. AYAD, M.F. TADROS, M.M. New LC–UV methods for pharmaceutical analysis of novel anti-diabetic combinations. **Acta Chromatographica**, v. 29, n. 4, p. 448-452, 2017.

GIL, E. S. Controle físico-químico da qualidade de medicamentos. 3ª edição. São Paulo: Pharmabooks, 2010. 512 p.

GOMORI, G. Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. **Methods Enzymology**, v.1, p. 138-146, 1955.

GOPAL, N.M., SRIDHAR, C. A validated stability indicating ultra-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of metformin hydrochloride and empagliflozin in bulk drug and tablet dosage form. **International Journal of Applied Pharmaceutics**, v. 9, n. 3, p. 45-50, 2017.

HEISE, T.; SEEWALDT-BECKER, E.; MACHA, S.; HANTEL, S. PINNETTI, S.; SEMAN, L.; WOERLE, H.J. Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics following 4 weeks' treatment with empagliflozina once daily in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Obesity Metabolism**, v. 15, n. 7, p. 613-621, 2013.

HEISE, T.; JORDAN, J.; WANNER, C.; HEER, M.; MACHA, S.; MATTHEUS, M.; LUND, S.S.; WOERLE, H.J.; BROEDL, U. Pharmacodynamic Effects of Single and Multiple Doses of Empagliflozin in Patients With Type 2 Diabetes. **Clinical Therapeutics**, v. 38, n. 10, p. 2265-2276, 2016.

HERMANS, A.; ABEND, A.M.; KESISOGLU, F.; FLANAGAN, T. COHEN, M.J.; DIAZ, D.A.; MAO, Y.; ZHANG, L.; WEBSTER, G.K.; LIN, Y.; HAHN, D.A.; COUTANT, C.A.; GRADY, H. Approaches for Establishing Clinically Relevant Dissolution Specifications for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms. **The AAPS Journal**, v. 19, n. 6, 2017.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: **impurities in new drug substances** – Q3A(R), 2002.

ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: **Stability Testing of New Drug Substances and Products** - Q1A (R2), 2003.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: **Guideline on Validation of Analytical Procedure** – Q2 (R1), 2005.

KIM, J.; OTSUKA, K.; TERABE, S. On-line sample concentration in micellar electrokinetic chromatography with cationic micelles in a coated capillary. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 343-352, 2001.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de estabilidade e fundamentos de cinética química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J.L. Teoria e prática na indústria farmacêutica. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 265-278, 2004.

MACHA, S.; JUNGNIK, A.; HOHL, K.; HOBSON, D.; SALSALI, A.; WOERLE, H.J. Effect of food on the pharmacokinetics of empagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor, and assessment of dose proportionality in healthy volunteers. **International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 51, n. 11, p. 873-879, 2013.

MACHADO, J.C.; LANGE, A.D.; TODESCHINI, V.; VOLPATO, N.M. Development and validation of a discriminative dissolution method for atorvastatin calcium tablets using *in vivo* data by LC and UV methods. **AAPS PharmSciTech**, v. 15, n. 1, 2014.

MALERBI, D.A.; FRANCO, L.J. Multicenter study of the prevalence of Diabetes Mellitus and impaired glucose tolerance in the urban brazilian population aged 30-69 yr. **Diabetes Care**, v. 1, n. 1, p. 1509-1516, 1992.

MILECH, A.; OLIVEIRA, J.E.P.; VENCIO, S. et al. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2015-2016). São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016, 348p.

MOSLEH W.; SHARMA, A.; SIDHU, M.S.;PAGE, B.; SHARMA, U.C.; FARKOUH, M.E. The Role of SGLT-2 Inhibitors as Part of Optimal Medical Therapy in Improving Cardiovascular Outcomes in Patients with Diabetes and Coronary Artery Disease. **Cardiovasc Drugs and Therapy**, v. 31, n. 3, p. 311-318, 2017.

MOTTA, V.T. Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações. 5ª Ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2009. 400 p.

MUDALIAR, S.; POLIDORI, D.; ZAMBROWICZ, B.; HENRY, R.R. Sodium-glucose cotransporter inhibitors: Effects on renal and intestinal glucose transport: From Bench to Bedside. **Diabetes Care**, v. 38, n. 12, p. 2344-2353, 2015.

MUSCELLI, E.; ASTIARRAGA, B.; BARSOTTI, E.; MARI, A.; SCHLISS, F.; NOSEK, L.; HEISE, T.; BROEDL, U.C.; WOERLE, H.J.; FERRANNINI, E. Metabolic consequences of acute and chronic empagliflozin administration in treatment-naive and metformin pretreated patients with type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 59, p. 700-708, 2016.

NAUCK, M.A. Update on developments with SGLT2 inhibitors in the management of type 2 diabetes. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 8, p. 1335-1380, 2014.

PADMAJA, N.; VEERABHADRAM, G. Development and validation of analytical method for Simultaneous estimation of Empagliflozin and Linagliptin in bulk drugs and combined dosage forms using UV-visible spectroscopy. **Scholars Research Library. Der Pharmacia Lettre**, v. 7, n. 12, p. 306-312, 2015.

PADMAJA, N.; VEERABHADRAM, G. Method development and validation of RP-HPLC method for the estimation of empagliflozin in API. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 7, n. 2, p. 724-727, 2016.

PADMAJA, N.; VEERABHADRAM, G. A Novel Stability Indicating Rp-Uplc-Dad Method for Determination of Metformin and Empagliflozin in Bulk and Tablet Dosage form. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 33, n. 4, p. 1949-1958, 2017.

PYELL, U., *Electrokinetic Chromatography: Theory, Instrumentation e Applications*. Wiley, 2006.

RAO, R. N.; SHINDE, D.; TALLURI, M.V.N. K. Development and validation of a reversed phase liquid chromatographic method for separation and determination of related-substances of modafinil in bulk drugs. **Talanta**, v. 73, n. 3, p. 407-414, 2007.

RIZVIA, S. A. A.; DOB, D. P; SALEHC, A.M. **European Journal of Chemistry**, v. 2, p. 276-281, 2011.

SARAIVA, J.F.K.; HISSA, M.N.; FELÍCIO, J.S.; ADDOBBATI, C.; CAVALCANTI, J.; SARAIVA, G.L.; PIHA, T.; CHACRA, A.R. Diabetes mellitus no Brasil: características clínicas, padrão de tratamento e custos associados ao cuidado da doença. **Jornal Brasileiro de Economia da Saúde**, v. 8, n. 2, p. 80-90, 2016.

SCIFINDER. The choice for chemistry research. Empagliflozin. Disponível em: <https://scifinder.cas.org>. Acesso em Outubro de 2017.

SHUBROOK, J.H.; BOKAIE, B.B.; ADKINS, S.E. Empagliflozin in the treatment of type 2 diabetes: evidence to date. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 5793-5803, 2015.

SHYAMALA, K.; NIRMALA, J.; MOUNIKA, NANDINI, B. Validated stability-indicating RP-HPLC method for determination of empagliflozin. **Scholars Research Library. Der Pharmacia Lettre**, v. 8, n. 2, p. 457-464, 2016.

SILVA, J. A. F.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F.M., Terminologia Para Técnicas Analíticas De Eletromigração Em Capilares. **Química Nova**, v. 30, p. 740-744, 2007.

SIRISUTH, N.; EDDINGTON, N. In-Vitro-In-Vivo Correlation: Definitions and Regulatory Guidance. **International Journal of Generic Drugs**. Disponível em: [www.locumusa.com](http://www.locumusa.com). Acessado em: agosto de 2004.

TAHARA, A.; TAKASU, T.; YOKONO, M.; IMAMURA, M. KUROSAKI, E. Characterization and comparison of SGLT2 inhibitors: Part 3. Effects on diabetic complications in type 2 diabetic mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 809, p. 163–171, 2017.

TASKEEN, M.; TIRUNAGARI, M. QURESHI, H. K. Biorelevant and quality control dissolution method development and validation of Quetiapine Fumarate Tablets. **Acta Pharmaceutica Scientia**, v. 55, n. 1, 2017.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese Capilar: Conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493–511, 1997.

TERABE, S. Twenty-five years of micellar electrokinetic chromatography. **Procedia Chemistry**, v. 2, p. 2-8, 2010.

TORRES, R.M.; FERNANDES, J.D.; CRUZ, E.A. Adesão do portador de diabetes ao tratamento: Revisão Bibliográfica. **Revista Baiana de Enfermagem**, v. 21, n. 2/3, p. 61-70, 2007.

USP 39. The United States Pharmacopeia. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2016.

VINTHER, A.; SOEBERG, H. Temperature elevations of the sample zone in free solution capillary electrophoresis under stacking conditions. **Journal of Chromatography**, v. 559, p. 21-42, 1991.

WATSON, D.G. Pharmaceutical Analysis. A Textbook for pharmacy students and pharmaceutical chemists. Edinburgh: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.

WHALEN, K.; MILLER, S.; ONGE, E. St. The Role of Sodium-glucose Co-Transporter 2 Inhibitors in the Treatment of Type 2 Diabetes. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 6, p. 1150-1166, 2015.

YOSHIOKA S.; STELLA, V. J. Stability of Drugs and Dosage Forms. New York, 2002.

ZHAO, S.; LANG, B.; BROEDL, U.C.; SALSALI, A.; PINNETTI, S.; MACHA, S. ZHAO, X. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Properties and Tolerability of Single and multiple-dose Once-daily Empagliflozina, a Sodium Glucose Cotransporter 2



Inhibitor, in Chinese Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. **Clinical Therapeutics**, v. 37, n. 7, p. 1493-1502, 2015.

ZINMAN, B.; WANNER, C.; LACHIN, J.M.; FITCHETT, D.; BLUHMKI, E.; HANTEL, S.; MATTHEUS, M.; DEVINS, T.; JOHANSEN, O.E.; WOERLE, H.J.; BROEDL, U.C.; INZUCCHI, S.E. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. **The new england journal of medicine**, v. 373, n. 22, p. 2117-2128, 2015.