

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

**Suelen Leticia Burin**

**EMPAGLIFLOZINA: DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO,  
IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTO DE DEGRADAÇÃO E  
DERIVAÇÃO FARMACÊUTICA PARA USO HOSPITALAR**

Santa Maria, RS  
2019

**Suelen Leticia Burin**

**EMPAGLIFLOZINA: DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO,  
IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTO DE DEGRADAÇÃO E  
DERIVAÇÃO FARMACÊUTICA PARA USO HOSPITALAR**

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

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

Santa Maria, RS  
2019

**Suelen Leticia Burin**

**EMPAGLIFLOZINA: DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO,  
IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTO DE DEGRADAÇÃO E  
DERIVAÇÃO FARMACÊUTICA PARA USO HOSPITALAR**

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

**Aprovado em 11 de março de 2019:**



---

**Andréa Inês Horn Adams, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



---

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



---

**Luciane Varini Laporta, Dr<sup>a</sup>. (UFN)**

Santa Maria, RS  
2019

*Dedico esta conquista à minha família  
que apesar da distância esteve sempre ao meu lado.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por estar sempre comigo, guiando meus passos e minha vida.

À Universidade Federal de Santa Maria por todas as oportunidades de conhecimento, desenvolvimento profissional e pessoal e pela minha formação. Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por todo suporte, pela oportunidade de desenvolver e concretizar este trabalho.

À prof. Andréa, pela disponibilidade em ensinar constantemente. Agradeço toda dedicação, apoio, compreensão e confiança. Obrigada por ter me acolhido durante a iniciação científica e mestrado. Grata pela orientação, incentivo e pelos bons momentos de risos que nos faziam esquecer das dificuldades, és um exemplo de professora e orientadora.

Aos meus pais, Ladi e Iêda, e ao meu irmão Murilo, por todo amor, carinho, incentivo e apoio às minhas escolhas, por fazerem dos tempos difíceis um momento passageiro, por aceitarem que a distância seria apenas física, mas que nossos pensamentos estariam sempre juntos. Obrigada por acreditarem em mim.

Ao Jonatan, meu maior incentivador. Você foi fundamental em todos os momentos. Obrigada pelo amor incondicional, incentivo, carinho, pelas palavras de conforto, pelo apoio desde o início da minha caminhada acadêmica, obrigada por tornar tudo mais leve.

Às colegas do LabCQ, Pauline, Rebeca, Alieni, Mariane, Matheus, Letícia, Ana Isa e Daniele pela ótima convivência, apoio e ajuda. À Lara, minha companheira de EC, aprendi muito contigo. À Juliana minha primeira dupla da faculdade e companheira de LabCQ. Obrigada por toda ajuda, amizade, apoio, carinho, parceria para todos os momentos. Laís, pela amizade, conversas e risadas. À Priscila, pela convivência, amizade, ajuda, lembranças e esquecimentos.

Às minhas amigas à primeira vista, Vinícia e Susana, que fizeram a faculdade ser mais divertida e leve. Obrigada pelo nosso trio inseparável. Obrigada por estarem na minha vida. À Nadine, minha fiel parceira para todas as horas. Obrigada pelos momentos de apoio, pelas risadas, pelos conselhos e todos os momentos inesquecíveis no 902. Obrigada pela tua amizade. Aos amigos de graduação que se tornaram amigos para toda a vida, meus jagaredos, Vinícius, Aline, Luís Gustavo, Verônica, Leísa, Francieli. Vocês fizeram toda a diferença na minha jornada.

Às minhas amigas de infância Aline e Chaline pelo carinho e amizade desde sempre. Obrigada pelo incentivo e apoio nas horas difíceis e momentos felizes. Vocês fazem parte de tudo isso.

Enfim, agradeço a todos, que de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho.

## RESUMO

### **EMPAGLIFLOZINA: DESENVOLVIMENTO ANALÍTICO, IDENTIFICAÇÃO DE PRODUTO DE DEGRADAÇÃO E DERIVAÇÃO FARMACÊUTICA PARA USO HOSPITALAR**

AUTORA: Suelen Leticia Burin

ORIENTADORA: Andréa Inês Horn Adams

Diabetes é um conjunto de distúrbios metabólicos e afeta mais de 400 milhões de pessoas em todo o mundo. A diabetes tipo 2 é caracterizada por defeitos na ação e secreção de insulina, assim como na regulação da produção hepática de glicose. A empagliflozina (EMP) pertence à classe das gliflozinas, que são fármacos inibidores do cotransportador de sódio-glicose-2, usados por via oral para o tratamento do diabetes tipo 2. O fármaco foi autorizado pelo FDA em 2014 e é vendido na forma de comprimidos revestidos de 10 e 25 mg (Jardiance®). Suspensões extemporâneas de EMP (2 mg/mL) utilizando comprimidos foram preparadas, empregando como polímeros hidroxipropilmetilcelulose (F1) ou carboximetilcelulose sódica (F2), para prover uma alternativa a pacientes com dificuldade de deglutição em ambiente hospitalar. As formulações foram armazenadas a 25 °C e sua estabilidade avaliada durante 60 dias (t60), pelos testes de doseamento, pH, volume de sedimentação, tamanho de partícula, tempo de redispersão e controle microbiológico. A quantificação da EMP nas amostras foi realizada por cromatografia capilar eletrocínica micelar, método previamente validado. As fórmulas preparadas apresentaram valores de pH inalterados, que permaneceram em torno de 6,5; de modo semelhante, o tamanho de partícula e o volume de sedimentação não mostraram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) ao longo do estudo. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os teores de F1 e F2 durante 25 dias, que foi de  $97,97 \pm 1,12\%$  e  $99,92 \pm 1,20\%$ , respectivamente; ambas as formulações apresentaram carga microbiana dentro dos limites especificados em t25, que foi considerado o prazo de validade das formulações. Na sequência, um método simples indicativo de estabilidade por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) foi desenvolvido para o doseamento da empagliflozina. A fase móvel foi composta de metanol, acetonitrila e água purificada (60:5:35 v/v), com vazão de 1 mL/min e detecção em 225 nm. A curva de calibração foi linear no intervalo de 5 a 150 µg/mL. O método mostrou-se preciso, exato e robusto. Para o estudo da degradação forçada, o padrão de empagliflozina e os comprimidos foram expostos a condições de estresse e o produto de degradação majoritário formado após a exposição do fármaco à radiação UVC (PD<sub>UVC</sub>) foi isolado e analisado por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS). A estrutura do PD<sub>UVC</sub> foi sugerida e a rota envolvida na degradação fotolítica da empagliflozina foi proposta.

**Palavras-chave:** Preparações extemporâneas. Formulações hospitalares. Produtos de degradação. Produto majoritário. Degradação forçada.

## ABSTRACT

### EMPAGLIFLOZIN: ANALYTICAL DEVELOPMENT, IDENTIFICATION OF DEGRADATION PRODUCT AND PHARMACEUTICAL DERIVATION FOR HOSPITAL USE

AUTHOR: Suelen Leticia Burin

ADVISOR: Andréa Inês Horn Adams

Diabetes is a set of metabolic disorders and affects more than 400 million individuals worldwide. Type 2 diabetes is characterized by defects in insulin action and secretion, as well as in the regulation of hepatic glucose production. Empagliflozin (EMP) belongs to the gliflozines that are sodium-glucose-2 cotransporter inhibitors, used by oral route to the treatment of type 2 diabetes. The drug was approved by FDA in 2014 and is sold as coated tablets containing 10 and 25 mg (Jardiance®). EMP extemporaneous suspensions (2 mg/mL) using commercial tablets were prepared, using hydroxypropylmethylcellulose (F1) or sodium carboxymethylcellulose (F2) as polymers, to provide an alternative for patients who have difficulty in swallowing tablets for hospital use. The formulations were stored at 25 °C and their stability evaluated for 60 days (t60), by the tests of assay, pH, sedimentation volume, particle size, time of redispersion and microbiological control. The EMP quantitation was performed by micellar electrokinetic capillary chromatography that was previously validated. The preparations showed unchanged pH values, which remained around 6.5 over the period; similarly, parameters such as particle size and sedimentation volume showed no difference ( $p > 0.05$ ) during the study. The results showed no statistical difference ( $p > 0.05$ ) between F1 and F2 content over 25-days of storage, which were  $97.97 \pm 1.12\%$  and  $99.92 \pm 1.20\%$  respectively; both formulations presented microbial levels within the limits specified at t25 that was considered the shelf-life. In sequence, a simple stability-indicating method by high performance liquid chromatography (HPLC) was developed to assay empagliflozin. The mobile phase was composed by methanol, acetonitrile and purified water (60:5:35 v/v), at a flow rate of 1 mL/min and detection at 225 nm. Calibration curve was linear in the range of 5 to 150 µg/mL. The method showed to be precise, accurate and robust. To forced degradation study, empagliflozin standard and tablets were exposed under stress conditions and the major degradation product evidenced after drug exposure to UV-C radiation was isolated and analyzed by high resolution mass spectrometry (HRMS). The structure of PD<sub>UV-C</sub> was suggested and the route involved in the photolytic degradation of empagliflozin was proposed.

**Keywords:** Extemporaneous preparations. Hospital formulations. Degradation products. Majority product. Forced degradation.

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1: Métodos validados para empagliflozina encontrados na literatura.....	21
Tabela 2: Limites de impurezas segundo a RDC 53 da ANVISA.....	25

### CAPÍTULO I

Table 1: Results obtained to accuracy using the proposed EC method.....	39
Table 2: Physico-chemical stability of F1, stored at 25 °C over 60 days. ....	40
Table 3: Physico-chemical stability of F2 stored at 25 °C over 60 days. ....	40

### CAPÍTULO II

Table 1: Values used in the CCD for three factors. ....	50
Table 2: Coded values and responses for resolution (R), theoretical plates (N), asymmetry (A), capacity factor (K') and retention time (Rt).....	53
Table 3: ANOVA results for CCD 5% level of significance.....	55
Table 4: Results of forced degradation test expressed as residual content of EMP standard and sample. ....	57
Table 5: Results obtained to accuracy using the proposed HPLC method. ....	59
Table 6: Results of the method robustness study.....	59
Table 7: Data obtained from HRMS analysis. ....	63



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: Estrutura química da empagliflozina.....	20
--	----

### CAPÍTULO I

Figure 1: EMP residual values in buffers of pH range from 2.0 at 8.0, evaluated at zero time, 2, 4, 8 and 14 day after compounding .....	37
Figure 2: Electropherograms of placebo (a), standard (b) and sample (c) .....	38

### CAPÍTULO II

Figure 1: Contour plots of results for tailing factor (a), theoretical plates (b), resolution (c), capacity factor (d) and retention time (e) vs. % methanol and % ACN. Fixed factor: Purified water pH $7.0 \pm 0.5$ . .....	56
Figure 2: a) Chromatogram of standard b) Chromatogram of sample c) Chromatogram of sample under UV-A degradation c) Chromatogram of sample under UV-C degradation e) Spectrums of $DP_{UVA}$ and $DP_{UVC}$ .....	61
Figure 3: Full-scan mass spectrum obtained of EMP standard. ....	62
Figure 4: High resolution MS/MS spectrum of $DP_{UVC}$ .....	63
Figure 5: Proposed chemical mechanism to $DP_{UVC}$ . ....	64

### DISCUSSÃO GERAL

Figura 2: Cromatogramas da amostra íntegra (a) e após condições de degradação: UV-A (b), UV-C (c), NaOH 2 M (d), HCl 1 M (e), H <sub>2</sub> O (f), CuSO <sub>4</sub> 0,01 M (g) e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30% (h).....	70
Figura 3: Cromatograma da amostra degradada utilizando fase móvel MeOH:H <sub>2</sub> O (60:40, v/v) e coluna analítica (a) e coluna semi-preparativa (b). ....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	<i>Asymmetry</i>
ACN	<i>Acetonitrile</i>
CCD	<i>Central Compound Design</i>
CMC	<i>Sodium carboxymethylcellulose</i>
DP	<i>Degradation product</i>
DP <sub>UVA</sub>	<i>Degradation product by UVA degradation</i>
DP <sub>UVC</sub>	<i>Degradation product by UVC degradation</i>
DPR	Desvio padrão relativo
EMP	Empagliflozina
HbA1c	Hemoglobina glicosada
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HPMC	<i>Hydroxypropylmethylcellulose</i>
HRMS	<i>High-Resolution Mass Spectrometry</i>
F1	Formulação 1
F2	Formulação 2
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ICH	<i>International Conference on Harmonization</i>
<i>K'</i>	<i>Capacity factor</i>
LC	<i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid chromatography tandem mass spectrometry</i>
LDL	<i>Low-density lipoprotein</i>
LOD	<i>Limits of detection</i>
LOQ	<i>Limits of quantitation</i>
MEKC	<i>Micellar electrokinetic chromatography</i>
MeOH	Metanol
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
<i>N</i>	<i>Theoretical plates</i>
PDA	<i>Photodiode array</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
Q-TOF	<i>Quadrupole Time-of-Flight</i>
<i>R</i>	<i>Resolution</i>

RSD	<i>Relative standard deviation</i>
RSM	<i>Response surface methodology</i>
Rt	<i>Retention time</i>
SGLT2	<i>Sodium-glucose co-transporter 2</i>
UHPLC	<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 OBJETIVOS .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	18
3.1 DIABETES MELLITUS .....	18
3.2 EMPAGLIFLOZINA .....	19
3.3 DERIVAÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS .....	22
3.3 PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO.....	24
3.5 ESTUDOS DE ESTABILIDADE .....	26
4 CAPÍTULO I – DEVELOPMENT AND STABILITY ASSAY OF EXTEMPORANEOUS FORMULATIONS OF EMPAGLIFLOZIN .....	31
5 CAPÍTULO II – DEVELOPMENT OF A LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD TO ASSAY EMPAGLIFLOZIN AND IDENTIFICATION OF THE MAJOR PHOTOPRODUCT BY QUADROPOLE TIME-OF-FLIGHT MASS SPECTROMETRY.....	47
6 DISCUSSÃO GERAL .....	68
7 CONCLUSÕES .....	73
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75



## 1 INTRODUÇÃO

O diabetes é uma patologia oriunda de um conjunto de distúrbios metabólicos, que se caracteriza pela hiperglicemia e que é classificado em diabetes mellitus tipo 1 e tipo 2. O diabetes tipo 1 é caracterizado pela destruição das células beta que levam a uma deficiência de insulina. É uma doença autoimune, representa cerca de 5 a 10% dos casos e acomete, geralmente, crianças e jovens. O diabetes tipo 2 caracteriza-se por defeitos na ação e secreção da insulina e na regulação da produção hepática de glicose. É causada por uma interação de fatores genéticos e ambientais e representa 90 a 95% da população diagnosticada com DM (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015; MILECH; OLIVEIRA; VENCIO, 2016). A Federação Internacional de Diabetes (IDF, do idioma inglês, *International Diabetes Federation*) estima que 425 milhões de pessoas tenham diabetes no mundo sendo 327 milhões entre 20-64 anos e 98 milhões entre 65-79 anos. O Brasil é o 4º país com maior número de pessoas com diabetes no mundo representando 12,5 milhões de pessoas (IDF, 2018).

As gliflozinas, classe à qual pertence a empagliflozina, são inibidores potentes do cotransportador de sódio e glicose 2 (SGLT2), o qual é responsável pela reabsorção renal de glicose. Os fármacos da classe demonstram eficácia na redução da glicose, um perfil de segurança favorável e efeitos benéficos sobre o peso, pressão arterial e doenças cardiovasculares (HEISE et al., 2013; WILDING et al., 2009), sendo usados no tratamento da diabetes tipo 2, por via oral.

Em 2013, o FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a canagliflozina, o primeiro fármaco da classe dos inibidores de SGLT2 para uso nos Estados Unidos. Em 2014, mais dois novos fármacos desta mesma classe foram aprovados, a dapagliflozina e a empagliflozina. No Brasil, a empagliflozina é comercializada desde 2015 na forma de comprimidos revestidos contendo 10 e 25 mg de princípio ativo. A empagliflozina apresenta rápida absorção e distribuição, apresentando pico de concentração em 1 hora. Sua meia-vida é de 12 horas e sua posologia é de 1 comprimido ao dia (EMPAGLIFLOZINA, 2015).

Apesar da liberação recente, há vários métodos já relatados na literatura voltados para o doseamento em matéria-prima e comprimidos por cromatografia a líquido de alta eficiência (PADMAJA; VEERABHADRAM, 2016; SHYAMALA et al., 2016; SWARUPA et al., 2016), por espectrofotometria no UV-visível (AYOUB, 2016; PADMAJA; VEERABHADRAM, 2015), por cromatografia de ultra-alta eficiência (AYOUB, 2015; GOPAL; SRIDHAR, 2017) e por cromatografia a líquido acoplada a espectrometria de massas (ABDEL-GHANY et al., 2016; ZHOU et al., 2016). No entanto, ainda inexitem

monografias farmacopeicas para a avaliação do fármaco. Em alguns dos métodos citados, foi evidenciado o surgimento de produtos de degradação após a realização de estudos de degradação forçada, no entanto, sua identidade não foi estudada. Cabe salientar que os estudos de estabilidade vêm recebendo mais destaque dos órgãos regulatórios, que passaram a exigir a notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação obtidos nos estudos de degradação forçada, ainda que presentes em baixa quantidade (BRASIL, 2015; ICH, 2006).

Outra abordagem desse projeto é o estudo da estabilidade de preparações extemporâneas obtidas a partir de comprimidos de empagliflozina, com finalidade de uso em hospitais. Na prática clínica, por vezes é necessário adaptar as formas farmacêuticas disponíveis, visando a atender demandas específicas de pacientes (STORPIRTIS, 2011). Essa prática, exclusivamente hospitalar, é respaldada legalmente pela RDC 67 (BRASIL, 2007) e é uma prática economicamente vantajosa devido à individualização de dose. Isso também melhora a adesão ao tratamento pelo paciente uma vez que o medicamento é adaptado as suas necessidades (VENTURA 2011). As formas farmacêuticas líquidas são as mais adequadas para pacientes pediátricos, pacientes com dificuldade de deglutição e/ou pacientes que fazem uso de sondas nasogástricas (GLASS; HAYWOOD, 2006; MAGNUSON et al., 2005). No entanto, uma problemática relacionada a essa prática são a falta de estudos de estabilidade físico-química e a carência de procedimentos analíticos que assegurem a qualidade do produto (STORPIRTIS, 2011).

Face ao exposto, este trabalho foi desenvolvido de modo a contribuir para o conhecimento acerca da estabilidade da empagliflozina, tanto sua estabilidade intrínseca quanto sua estabilidade em formulações a fim da obtenção de preparações estáveis.

O trabalho está estruturado na forma de dois artigos científicos, a serem submetidos. No Capítulo 1 é descrito o desenvolvimento de formulações extemporâneas líquidas orais a partir de comprimidos contendo empagliflozina e seu estudo de estabilidade. O Capítulo 2 trata do planejamento fatorial, desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia a líquido de alta eficiência para comprimidos de empagliflozina e identificação do produto de degradação majoritário após degradação forçada por radiação UVC.





## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar a estabilidade de suspensões extemporâneas obtidas a partir de comprimidos de empagliflozina com finalidade de uso hospitalar, desenvolver método analítico indicativo de estabilidade por CLAE e identificar eventuais produtos de degradação majoritários da empagliflozina, formados em estudos de degradação forçada.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver preparações extemporâneas líquidas de uso oral preparadas a partir de comprimidos de empagliflozina utilizando dois diferentes polímeros;
- ✓ Avaliar a estabilidade físico-química e microbiológica das formulações;
- ✓ Realizar degradações forçadas da empagliflozina submetendo os comprimidos a condições de estresse como meio alcalino, neutro, ácido e oxidativo, presença de metais pesados e radiações UV-A e UV-C;
- ✓ Isolar o(s) produto(s) de degradação majoritário(s) por cromatografia a líquido de alta eficiência semi-preparativa;
- ✓ Identificar o(s) produto(s) de degradação com auxílio da espectrometria de massas de alta resolução.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 DIABETES MELLITUS

O diabetes é uma patologia oriunda de um conjunto de distúrbios metabólicos e que se caracteriza pela hiperglicemia, resultante de defeitos na ação da insulina, na secreção de insulina ou em ambas. O diabetes é classificado em diabetes tipo 1 e diabetes tipo 2. O diabetes tipo 1 é caracterizado por destruição das células beta do pâncreas que levam à deficiência de insulina. Denominada autoimune, representa cerca de 5 a 10% da patologia e acomete, geralmente, crianças e jovens. O diabetes tipo 2 é o tipo mais comum de diabetes e caracteriza-se pela inadequada secreção da insulina e na incapacidade do organismo responder a tamanha quantidade de glicose sanguínea. O diabetes tipo 2 representa 90 a 95% dos casos diagnosticados, incluindo crianças, adolescentes e idosos, em sua maioria. É causada por uma interação de fatores genéticos, como a resistência à insulina, e ambientais, como sobrepeso, obesidade e dieta não-balanceada (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015, MILECH; OLIVEIRA; VENCIO, 2016).

O IDF estima que 425 milhões de pessoas tenham diabetes no mundo, sendo 327 milhões entre 20-64 anos e 98 milhões entre 65-79 anos. O Brasil é o 4º país com maior número de pessoas com diabetes no mundo, representando 12,5 milhões de pessoas entre 20 e 79 anos em 2017. A estimativa é de que em 2045, 20 milhões de pessoas nesta faixa etária sejam portadoras da doença no Brasil (IDF, 2018). Além disso, os gastos mundiais de saúde relacionados com a doença já são estimados em 727 bilhões de dólares, somando custos individuais e auxílios públicos. Isso representa 8% a mais que em 2015 significando um agravamento da doença nos últimos dois anos (IDF, 2018).

O tratamento do diabetes objetiva diminuir os níveis de glicose sem causar hipoglicemia, ganho de peso e aumento da resistência à insulina, porém muitas vezes esses fatores são limitantes no tratamento da diabetes tipo 2. O tratamento compreende a intervenção farmacoterapêutica agregada à boa alimentação e exercício físico com o intuito de reduzir os níveis de glicose sanguínea. Há oito classes de fármacos hipoglicemiantes orais indicados para pacientes com diabetes diagnosticado. São eles: sulfoniluréias, glinidas, inibidores das alfa-glicosidases, biguanidas, glitazonas, gliptinas, miméticos e análogos do GLP-1 (glucagon-like-peptide-1), e inibidores do cotransporte sódio-glicose 2 (SGLT2) (MILECH; OLIVEIRA; VENCIO, 2016; WILDING, 2016).

Medicamentos pertencentes à classe das gliflozinas são potentes inibidores dos receptores SGLT2, os quais são responsáveis pela reabsorção de glicose renal. Esta classe promissora demonstrou eficácia na redução da glicose, um perfil de segurança favorável e efeitos benéficos sobre o peso, pressão arterial e doenças cardiovasculares (HENSE, 2009; WINLDING, 2009) uma vez que pessoas com diabetes são duas a três vezes mais propensas a terem doença cardiovascular que pessoas sem diabetes (BAENA-DIEZ, 2016; IDF, 2018).

Em 2013, o Food and Drug Administration (FDA) aprovou a canagliflozina, o primeiro fármaco da classe dos inibidores de SGLT2 para uso nos Estados Unidos. Em 2014, mais dois novos fármacos desta mesma classe foram aprovados, a dapagliflozina e a empagliflozina. Os três fármacos descritos são potentes inibidores competitivos, preferencialmente, para os receptores SGLT2 nos túbulos proximais dos rins. No entanto, vale ressaltar a empagliflozina que, dentre eles, possui uma seletividade 2500 vezes maior para os receptores SGLT2 (presente exclusivamente nos rins) em comparação com os receptores SGLT1 (presente nos rins e no intestino delgado). Devido a essa alta seletividade, a empagliflozina possui a vantagem de apresentar menos efeitos adversos gastrintestinais que os demais fármacos da mesma classe (WHALEN, 2015, GREMLER et al., 2010, GERICH, 2010).

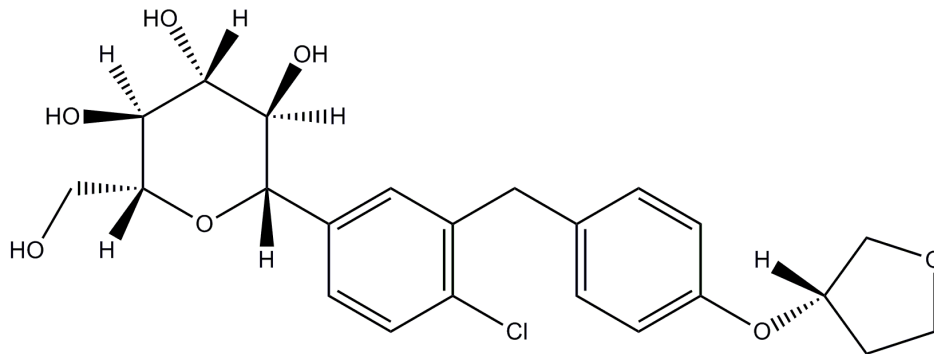
### 3.2 EMPAGLIFLOZINA

A empagliflozina ( $C_{23}H_{27}ClO_7$ ; PM = 450,8831 g, Figura 1) é um fármaco hipoglicemiante, inibidor altamente seletivo para receptores SGLT2 usada no tratamento de diabetes tipo 2 (GREMLER et al., 2012; SEMAN et al., 2013).

Sintetizada pela empresa Boehringer Ingelheim (Alemanha) em 2005 (GREMLER et al., 2012), a empagliflozina foi aprovada pelo FDA em 2014 para comercialização nos Estados Unidos da América. A venda no Brasil foi liberada em 2015 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e é comercializada na forma de comprimidos revestidos orais para liberação imediata nas dosagens de 10 e 25 mg, com o nome comercial Jardiance® (EMPAGLIFLOZINA, 2015).

Quanto às características físico-químicas da molécula têm-se: pKa 13,23, logP 1,163, insolúvel em água, solúvel em etanol e diclorometano, e ponto de fusão 148-153 °C (CHEMICALIZE).

Figura 1: Estrutura química da empagliflozina



Fonte: Autor

É administrada como monoterapia ou em associação com outros fármacos hipoglicemiantes, incluindo insulina, metformina, linagliptina, pioglitazona, sulfonilureia, entre outros (EMPAGLIFLOZINA, 2015; KOHLER et al., 2016).

Seu mecanismo de ação consiste em bloquear a reabsorção de glicose no túbulo proximal dos rins e, conseqüentemente, aumentar a excreção da glicose na urina. Isso resulta na diminuição da glicose plasmática e de hemoglobina glicosada (HbA1c) em pacientes com diabetes tipo 2 (MACHA et al., 2014; SEMAN et al., 2013). Seu uso também está associado com a perda de peso e redução da pressão sanguínea, sem interferência na frequência cardíaca (ZINMAN et al., 2015). Além disso, a empagliflozina demonstrou ser eficaz na redução de risco em doenças cardiovasculares e morte por outras causas em pacientes com diabetes tipo 2 (FRIEDRICH et al., 2013; HEISE et al., 2013).

Estudos farmacocinéticos demonstraram que a empagliflozina tem rápida absorção e distribuição, apresentando pico de concentração plasmática (C<sub>máx</sub>) em 1 hora e meia-vida de 12 horas. Em relação à farmacodinâmica, o início de ação ocorre em até 24 horas após a administração, evidenciado pela excreção de glicose na urina (MACHA et al., 2013). Heise e colaboradores demonstraram que a administração de 2,5 mg de empagliflozina diariamente aumenta 10 vezes a excreção de glicose na urina quando comparada ao placebo (HEISE et al., 2013). O mecanismo de ação da empagliflozina é independente da função das células beta e da insulina, contribuindo para um baixo risco de hipoglicemia (ZINMAN et al., 2015).

O uso da empagliflozina, porém, não é indicado a pacientes com suspeita ou diagnóstico de cetoacidose diabética e pacientes com disfunção renal moderada a grave já que a metabolização é renal, em idosos com mais de 85 anos de idade, devido à experiência

terapêutica limitada nesta população e em pacientes pediátricos e adolescentes menores de 18 anos, devido aos estudos de eficácia e segurança ainda não serem elucidados (EMPAGLIFLOZINA, 2015; MACHA et al., 2014).

Embora não existam métodos oficiais nos compêndios, diversos métodos já foram validados para a EMP em comprimidos como monoterapia ou em associação com a metformina e linagliptina. Também há métodos validados para doseamento da EMP em matéria-prima. Diversas técnicas foram utilizadas como espectrofotometria, cromatografia líquida e espectrometria de massas. Alguns desses métodos validados são demonstrados na tabela abaixo.

Tabela 1: Métodos validados para empagliflozina encontrados na literatura

<b>Amostra</b>	<b>Método/Condições experimentais</b>	<b>Solvente/Fase móvel</b>	<b>Autor</b>
Comprimidos (EMP + Lin)	Espectrofotometria UV 225 nm	Metanol	PADMAJA; VEERABHADRA, 2015
Comprimidos (EMP + Met)	Espectrofotometria UV 225 nm	Metanol	AYOUB et al., 2016; AYOUB at al., 2017
Matéria-prima	HPLC Coluna Intersil C18 (150x40 mm, 5 µm); vazão 2.0 mL/min 233 nm	Tampão acetato 0,01 M: metanol (30:70, v/v)	PADMAJA; VEERABHADRA, 2016
Matéria-prima	HPLC Hypersil BDS C18 vazão 1.0 mL/min 233 nm	0.1% ácido ortofosfórico: ACN (70:30, v/v)	SHYAMALA et al., 2016
Matéria-prima e comprimidos (EMP + Met)	HPLC Coluna C18 (250 mm×4.6 mm, 5 µm) vazão 1.0 mL/min 227 nm	Tampão fosfato pH 4,8: ACN: metanol (15:80:5, v/v/v)	SWARUPA et al., 2016
Comprimidos	HPLC Intersil® C18 (150 mm × 4 mm, 5 µm); Espectrofluorofotômetro (λ 70 nm; λ 297 nm); UHPLC-MS/MS Agilent® C18 (50 mm × 2,1 mm, 5 µm) 225 nm	ACN: tampão fosfato de potássio pH 4 (50:50, v/v)	ABDEL-GHANY; AYAD; TADROS, 2018

Tabela 1: Continuação

	UHPLC		
Matéria-prima e comprimidos (EMP + Lin+ Met)	Symmetry® Acclaim™ C18 (100mm×2.1mm, 2.2µm) 0.4 ml/min 225 nm	Tampão fosfato de potássio anidro pH 4,0: metanol (50:50, v/v)	AYOUB, 2015
	UHPLC		
Matéria-prima e comprimidos (EMP + Met)	Dikma C18 (50mm×2.1 mm, 1.8 µm); 1.0 ml/min 240 nm	Tampão fosfato (pH 3,0): metanol (30:70, v/v)	GOPAL; SRIDHAR, 2017
	LC-MS/MS		
Matéria-prima	Thermo BDS C18 (4.6mm×100 mm, 4mm); 0.7 ml/min	ACN: água (75:25, v/v)	ZHOU, 2016
	UHPLC-MS/MS		
Matéria-prima e comprimidos (Lin + EMP)	Waters C18 (50 mm×2.1 mm, 1.7 µm) 0.2 ml/min 225 nm	0.1 % ácido fórmico: ACN (50:50, v/v)	ALBEL-GHANY et al., 2016
	UHPLC-MS/MS		
Comprimidos (Met + EMP)	Acquity® BEH C18 (50 mm×2.1 mm, 1.7 µm) 0.2 ml/min	0.1% ácido fórmico: ACN (75:25, v/v)	AYOUB MOWAKA, 2017

Lin: linagliptina; Met: metformina

Alguns autores também já evidenciaram picos de produtos de degradação oriundos da degradação forçada, sem realizar, no entanto, estudos aprofundados sobre a caracterização dos mesmos (SHYAMALA et al., 2016; GOPAL; SRIDHAR, 2017; SWARUPA et al., 2016).

### 3.3 DERIVAÇÃO DE FORMAS FARMACÊUTICAS

A manipulação de medicamentos em ambiente hospitalar é uma prática comum que compete ao farmacêutico e exige uma infraestrutura adequada que atenda as Boas Práticas de Manipulação (BRASIL, 2007; MARINHO & CABRAL, 2014). Segundo a RDC nº 67 da ANVISA (BRASIL, 2007), derivação ou transformação de forma farmacêutica é a “manipulação de especialidade farmacêutica visando o preparo de uma forma farmacêutica a partir de outra”. Este procedimento é permitido exclusivamente às farmácias hospitalares e visa atender as necessidades terapêuticas exclusivas de pacientes em atendimento nos serviços de saúde.

A derivação de formas farmacêuticas deve atender aos seguintes requisitos: ser realizada para atender necessidades terapêuticas diferenciadas de pacientes hospitalizados; apresentar justificativa técnica ou embasamento em literatura científica; sua execução deve ser realizada apenas em caso de indisponibilidade da matéria-prima no mercado e ausência da especialidade farmacêutica na dose e concentração e/ou forma farmacêutica que atenda às necessidades do paciente; a preparação obtida por esta técnica será considerada de uso extemporâneo (BRASIL, 2007).

Essa prática ainda promove questionamentos sobre o comprometimento da estabilidade dos fármacos e a diminuição da ação terapêutica após as modificações das formas farmacêuticas comerciais como a partição e trituração de comprimidos ou a abertura de cápsulas (MARINHO & CABRAL, 2014; NISSEN; HAYWOOD; STEADMAN, 2009). O fato é que a derivação de formas farmacêuticas é necessária devido à maioria dos medicamentos comercializados estarem disponíveis nas formas farmacêuticas sólidas, o que dificulta sua administração em crianças ou pacientes com dificuldade de deglutição (HAYWOOD; GLASS, 2013; NISSEN; HAYWOOD; STEADMAN, 2009).

Além de ser uma prática economicamente vantajosa devido à individualização de dose, ela permite adaptar o medicamento de acordo com as necessidades específicas do paciente independente da forma farmacêutica disponível no mercado, melhorando a adesão ao tratamento (VENTURA, 2011).

As formulações extemporâneas obtidas a partir de outras formas farmacêuticas sólidas são consideradas complexas devido à adição de excipientes à formulação além dos já presentes nos comprimidos ou cápsulas. Por isso, a estabilidade físico-química deve ser analisada devido ao efeito dos excipientes adicionados (GLASS; HAYWOOD, 2006; HAYWOOD; GLASS; 2013; VENTURA, 2011). Além disso, comprimidos revestidos quando triturados podem prejudicar a eficácia do medicamento, por degradação de substâncias fotossensíveis ou pela diminuição da absorção do fármaco pelo organismo por comprometer a liberação (NISSEN; HAYWOOD; STEADMAN, 2009; VENTURA, 2011). Os comprimidos de empagliflozina são revestidos e, a partir da avaliação da função de cada excipiente e dos dados da bula, pressupõe-se que a função do revestimento seja a de conferir fotoproteção ou mascarar o sabor, uma vez que o medicamento é de liberação imediata.

Diversos autores e obras dedicadas a derivação de formas farmacêuticas ratificam sobre a falta de formas farmacêuticas líquidas no ambiente hospitalar e sugerem que novos produtos sejam desenvolvidos para essas formas farmacêuticas escassas (STORPIRTIS, 2011; SOUZA, 2003). Anlodipino, baclofeno, captopril, enalapril, espironolactona, furosemida,



fluconazol, hidroclorotiazida, isoniazida, lorazepam, metadona, pirimetamina, sulfadiazina são exemplos de fármacos comumente prescritos como formas farmacêuticas líquidas, os quais são indisponíveis como tal (STORPIRTIS, 2011).

Além disso, os estudos de estabilidade de formulações extemporâneas são escassos como destacam Glass e Haywood (2013) em que, dentre todas as formulações adaptadas, apenas 7,2% tiveram sua estabilidade avaliada. Apesar do baixo risco dessas formulações, é importante destacar que a derivação de formas farmacêuticas a partir de formas comerciais sólidas é uma alternativa terapêutica necessária para pacientes que demandam unicamente de formas líquidas para a administração de medicamentos.

### 3.4 PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO

Produtos de degradação podem ser formados pela exposição da forma farmacêutica ao oxigênio atmosférico, a altas temperaturas de armazenamento, a condições de umidade, assim como por meio de reações do fármaco com impurezas presentes na formulação, entre outros. Também podem ser gerados em procedimentos como os denominados “testes de degradação forçada”, os quais são usados na validação de métodos analíticos e também no estudo da estabilidade intrínseca de fármacos (BLESSY et al., 2014).

Como afirma Leite (2009), um dos objetivos da busca pelas impurezas de degradação é conhecer a toxicidade dos produtos de degradação visto que, mesmo em baixa concentração, podem ser tóxicos para quem os consome. Isso só é possível com o isolamento das espécies, o que pode ser feito a partir de técnicas como cromatografia em camada delgada, cromatografia em coluna clássica ou cromatografia a líquido de alta eficiência. Esta última é a técnica mais comum e utiliza colunas semi-preparativas que diferem de colunas analíticas por ter um diâmetro interno maior e permite obter uma análise qualitativa, por meio da comparação com o método analítico (LEITE, 2009). Essas técnicas buscam o conhecimento da distribuição das espécies na amostra com a finalidade de seletividade e isolamento para a identificação. Como estratégias de caracterização das espécies, técnicas como cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas permitem identificar o analito pela comparação de espectros com padrões de referência disponíveis ou permitem propor a sua estrutura, a partir da informação da massa molecular (LEITE, 2009; NARAYANAM et al., 2013).

A International Conference Harmonization (ICH) em seu Guia para Determinação de Impurezas em Novos Medicamentos apresenta os limites para notificação, identificação e/ou qualificação dos produtos de degradação em novos medicamentos (ICH, 2006). As

especificações consideram a dose diária máxima do medicamento e a quantidade de impurezas de degradação encontradas nos estudos de especificidade (ICH, 2006). O limite de notificação é o valor acima do qual um produto de degradação deve ser reportado no estudo de estabilidade; o limite de identificação é o valor acima do qual um produto de degradação deve ter sua estrutura química identificada e, por sua vez, o limite de qualificação é o valor acima do qual um produto de degradação deve ser qualificado, por testes que avaliem a segurança biológica (BRASIL, 2015).

No Brasil, o documento que estabelece esses parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em novos medicamentos é a RDC nº 53, criada e aprovada em 2015 pela ANVISA. Além dos limites especificados, ela também determina que os estudos de degradação forçada devam promover degradação suficiente a fim de permitir avaliação da formação de produtos de degradação (BRASIL, 2015).

Tabela 2: Limites de impurezas segundo a RDC 53 da ANVISA.

	<b>Dose máxima diária<sup>1</sup></b>	<b>Limites<sup>2</sup></b>
<b>Limite de Notificação</b>	≤ 1 g	0,1%
	> 1 g	0,05%
<b>Limite de Identificação</b>	< 1 mg	1,0% ou 5 µg ITD, o que for menor
	1 mg - 10 mg	0,5% ou 20 µg ITD, o que for menor
	> 10 mg - 2 g	0,5% ou 2 mg, o que for menor
	> 2 g	0,10%
<b>Limite de Qualificação</b>	< 10 mg	1,0% ou 50 µg ITD, o que for menor
	10 mg - 100 mg	0,5% ou 200 µg ITD, o que for menor
	> 100 mg - 2 g	0,2% ou 3 mg ITD, o que for menor
	> 2 g	0,15%

<sup>1</sup>Quantidade máxima do fármaco administrado por dia. <sup>2</sup>Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do fármaco ou como a ingestão total diária (ITD) de um produto de degradação.

Fonte: Adaptado da RDC 53/2015 da ANVISA (Brasil, 2015).

Embora existam guias e resoluções que auxiliam nos estudos de degradação de medicamentos, não há um padrão para a realização destes estudos o que torna um estudo complexo para pesquisadores e desenvolvedores de metodologias analíticas quanto à delimitação das condições de estresse de um novo fármaco (DIAS, 2014).

### 3.5 ESTUDOS DE ESTABILIDADE

A estabilidade é definida como o tempo durante o qual a matéria-prima ou a especialidade farmacêutica mantém, dentro dos limites especificados, sua integridade físico-química e microbiológica durante todo o período de armazenamento e uso. Avaliar a estabilidade do fármaco durante o desenvolvimento de um produto farmacêutico é fundamental para a garantia da qualidade, eficácia e segurança durante todo seu período de validade (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000; ICH, 2003). Durante o desenvolvimento de um produto farmacêutico, a estabilidade deve ser avaliada em relação à substância ativa, a interação fármaco-excipientes, os processos de produção, a forma farmacêutica, interferência do material de embalagem, armazenamento e transporte (temperatura, luz, umidade) (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

Os estudos de estabilidade da longa duração visam prever o tempo de validade do produto farmacêutico, ou seja, assegurar sua segurança e eficácia durante todo o período de uso pelo consumidor. Para estes estudos, o produto acabado é mantido sob condições usuais de transporte e armazenamento. Geralmente, os testes são realizados a  $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  e umidade relativa a  $75\% \text{ UR} \pm 5\%$  (BRASIL, 2005). O tempo pode levar 5 anos ou mais dependendo da deterioração físico-química (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

Os estudos de estabilidade acelerada objetivam aumentar a velocidade de degradações químicas ou físicas do produto. São empregadas temperaturas mais elevadas em relação ao estudo de longa duração ( $40\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ ) e a mesma umidade ( $75\% \text{ UR} \pm 5\%$ ) e visam extrapolar os efeitos de temperatura e umidade em condições que possam ocorrer durante o armazenamento e transporte (BRASIL, 2005; ICH, 2003).

Os produtos também podem passar por estudos de estabilidade forçada. São realizados em condições mais severas do que as usadas no estudo de estabilidade acelerada como condições extremas de temperatura, umidade, luz, estresse oxidativo, dentre outros. A degradação forçada é uma ferramenta usada para desenvolver métodos indicativos de estabilidade e avaliar a existência de prováveis produtos de degradação (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000).

Os estudos de fotoestabilidade de produtos farmacêuticos são importantes como parte integrante do teste de degradação forçada (ICH, 1996). É necessário determinar a fotoestabilidade dos produtos farmacêuticos durante o processo de desenvolvimento a fim de avaliar as características intrínsecas da molécula, as alterações físico-químicas frente a exposição à radiação, determinar a embalagem e o prazo de validade (AHMAD et al., 2016; ICH, 1996).

Como efeitos da fotodegradação, pode ocorrer inativação do princípio ativo levando a diminuição dos efeitos terapêuticos do medicamento e prejudicando sua eficácia. Além disso, reações fotoquímicas podem levar à degradação da matéria-prima ou produto farmacêutico por um ou mais caminhos para formar produtos diferentes. Os produtos de degradação formados podem ser tóxicos e comprometer a segurança do paciente (HENRY; FOTI; ALSANTE, 2009; TØNESSEN, 2004; TØNNESEN, 2008).

A radiação ultravioleta (UV) apresenta diferentes distribuições espectrais e é subdividida em quatro regiões distintas: UV-C (200–290 nm), UV-B (290–320 nm), UV-A (320–400 nm) e luz visível (400–780 nm). Comprimentos de onda de 290–700 nm representam os raios de incidência de luz solar na superfície da Terra, já os comprimentos de onda abaixo de 290 nm são absorvidos por gases na atmosfera e não atingem a superfície terrestre (AHMAD et al., 2016; HENRY; FOTI; ALSANTE, 2009). Apesar da não incidência de raios de baixo comprimento de onda, durante os testes de degradação forçada, podem ser usadas uma variedade de condições de exposição, dependendo da fotossensibilidade do fármaco envolvido e da intensidade das fontes de luz utilizadas. Esses níveis de exposição utilizados devem ser justificados (ICH, 1996).

Nos estudos de degradação forçada as amostras devem ser expostas em compartimentos transparentes e estéreis que não interfiram na análise. Além disso, a exposição deve ser de, no mínimo, 200 Wh m<sup>2</sup> ou 1,2 milhões de lux hora. Amostras protegidas da radiação denominadas controle-escuro devem ser analisadas a fim de avaliar o efeito térmico às amostras (ICH, 1996).

A avaliação de fotoestabilidade dos produtos farmacêuticos são uma parte importante dos estudos de formulação, fornecendo informações sobre suas características intrínsecas da molécula e cuidados com o medicamento, permitindo que ele seja estável pelo maior tempo possível durante todo o desenvolvimento e seu tempo de prateleira. Dessa forma, a avaliação da estabilidade torna-se parte importante do desenvolvimento dos fármacos e formas farmacêuticas a fim de garantir sua qualidade, segurança e eficácia durante toda a validade do produto.

**CAPÍTULO I – DEVELOPMENT AND STABILITY EVALUATION OF  
EMPAGLIFLOZIN EXTEMPORANEOUS FORMULATIONS**

---

#### **4.1 Apresentação**

Neste capítulo é descrito o desenvolvimento de formulações extemporâneas líquidas orais a partir de comprimidos contendo empagliflozina e seu estudo de estabilidade. Duas formulações extemporâneas foram preparadas e diferiam entre si pelos diferentes polímeros HPMC e CMC utilizados em cada formulação. As suspensões contendo 2 mg/mL de empagliflozina foram doseadas utilizando a técnica de eletroforese capilar micelar e avaliadas quanto às suas características físico-químicas e microbiológicas. Os testes para avaliação físico-química foram: avaliação do pH, volume de sedimentação, tempo de redispersão e tamanho de partícula.

## Development and stability evaluation of empagliflozin extemporaneous formulations

Suelen Leticia Burin<sup>1</sup>, Alieni Bitencourt de Souza<sup>2</sup>, Rebeca Lino Lourenço<sup>2</sup>, Andréa Inês Horn Adams<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Post-graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

Address all correspondence to Prof. Dr. Andréa I. H. Adams. Federal University of Santa Maria – UFSM. Av. Roraima, 1000. Santa Maria/RS - CEP 97105-900. Tel.: +55 55 3220 8661 Fax: +55 55 3220 8248. E-mail: [andrea.i.h.adams@gmail.com](mailto:andrea.i.h.adams@gmail.com)

**Abstract:** Empagliflozin is an inhibitor of sodium-glucose cotransporter 2 used in the treatment of patients with type 2 diabetes and available only as tablets of 10 and 25 mg. In this study empagliflozin extemporaneous suspensions were prepared using commercial tablets as the source of active pharmaceutical ingredient. Two different suspensions at 2 mg/mL were prepared with hydroxypropylmethylcellulose (F1) and sodium carboxymethylcellulose (F2). The formulations were stored at 25 °C and evaluated for 60 days by assay, pH, sedimentation volume, particle size, redispersibility and microbial limits. A micellar electrokinetic capillary chromatography method previously validated was used to assay empagliflozin in samples. The prepared formula presented no variation in the pH values during the study that were consistent with the administration route; in addition, the particle size and the sedimentation volume showed no difference ( $p > 0.05$ ) over the 60 day-period. F1 presented characteristics closer to a deflocculated suspension with a longer redispersion time, while the data suggest that F2 could be a flocculated suspension, with better redispersion. The results showed no statistical difference ( $p > 0.05$ ) between F1 and F2 content after storage for 25 days, which was  $97.97 \pm 1.12$  and  $99.92 \pm 1.20$  respectively, remaining within the considered stability of 95%. The set of results over the 60 days suggested better physico-chemical of F2, however, the microbiological data limited the use of both for 25 days. Taking these results into account, these EMP formulations should be considered suitable for patients with difficulty in swallowing for hospital use.

**Keywords:** diabetes mellitus; oral formulations; hospital preparation, extemporaneous suspensions.

## 1. Introduction

Diabetes is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia. The International Diabetes Federation estimates that 425 million people have diabetes in the world being 327 million between 20-64 years and 98 million between 65-79 years (IDF, 2018). Type 1 diabetes is characterized by destruction of the pancreas beta cells leading to an insulin deficiency. Type 2 diabetes is the most common type of diabetes and is characterized by inadequate insulin secretion and the body's inability to respond to such a large amount of blood glucose.

Empagliflozin ( $C_{23}H_{27}ClO_7$ ; MM = 450.9 g) is a hypoglycemic drug, a highly selective inhibitor of sodium-glucose cotransporter-2 (SGLT2) receptors used in the treatment of type 2 diabetes (GREMLER et al., 2012; SEMAN et al., 2013). Empagliflozin inhibits the glucose reabsorption in the kidneys proximal tubule and consequently increases the excretion of glucose in the urine, resulting in the reduction of plasma glucose and glycated hemoglobin (HbA1c) in patients with type 2 diabetes (MACHA et al., 2014; SEMAN et al., 2013). To its use is associated weight loss, blood pressure reduction and increased levels of low-density lipoprotein (LDL) (ZINMAN et al., 2015). Furthermore, empagliflozin has been shown to be effective in reducing the risk of cardiovascular disease and death from other causes in patients with type 2 diabetes (FRIEDRICH et al., 2013; HEISE et al., 2013). Empagliflozin is absorbed rapidly after oral administration, exhibiting peak plasma concentration ( $C_{max}$ ) after one to 2 hours, with a half-life of approximately 13 hours, making possible a daily dose (GREMLER et al., 2012, MACHA et al., 2014).

Synthesized by Boehringer Ingelheim (Germany) in 2005 (GREMLER et al., 2012), empagliflozin was approved by FDA in 2014. Jardiance® is available as 10 and 25 mg coated tablets for immediate release. The evaluation of the Jardiance package insert suggests that the coating could be related to the taste masking or photoprotection (EMPAGLIFLOZINA, 2015). The lack of commercially available oral liquid dosage forms is an ongoing problem for healthcare providers that are challenged to providing extemporaneous oral liquids, from commercially available products. This is usual in the treatment of pediatric patients, where non-standard doses are required and more accurately measured by using a liquid formulation. Dysphagia is very common in elderly patients, and is related to diseases as Parkinson, Alzheimer and other dementias, stroke and cancer. Thus, adults experiencing difficulty in swallowing or patients receiving medicines via nasogastric or gastrostomy tubes will also require these preparations (HAYWOOD, GLASS, 2013; NISSEN; HAYWOOD;



STEADMAN, 2009; ZAID et al., 2017). In addition to being an economically advantageous practice due to dose individualization, it adapts the drug according to the patient's specific needs independent of the available pharmaceutical form in the market, improving treatment adherence by the patient (VENTURA, 2011).

Extemporaneous formulations are usually prepared from commercially available oral solid dosage formulations by simply crushing tablets or opening capsules and subsequently adding water or another diluent (GLASS; HAYWOOD, 2006; PABARI, 2012). However, the use of an active pharmaceutical ingredient (API) obtained by modifying a commercially available tablet or capsule could have implications that may compromise the clinical treatment and physical-chemical stability of the drug (BERNAL et al., 2014; BONACUCINA et al., 2016; STORPIRTIS, 2011). For example, tablets coated when crushed may result in reduced effectiveness of the drug, degradation of photosensitive substances or the decrease in drug absorption by the body by compromising the release (NISSEN; HAYWOOD; STEADMAN, 2009; VENTURA, 2011). Therefore, knowledge about the stability of API and its excipients can reduce the risk associated to extemporaneous formulations (GLASS; HAYWOOD, 2006).

In this scenario, the development of a stable empagliflozin liquid formulation for extemporaneous use in hospitals would be of great benefit for patients who have difficulty in swallowing tablets. Therefore, the goal of this work was to develop extemporaneous formulations of EMP, prepared according to the usual techniques in hospitals, and to evaluate the physical-chemical and microbiological stability of these formulations, stored at 25°C, for 60 days.

## **2. Methods**

### **2.1 Reagents**

Empagliflozin (EMP) standard (99.77%, CAS 864070-44-0, Lot E160597L) was purchased from Triplebond<sup>®</sup> (Guelph Ontario, Canada). Acetaminophen, used as internal standard in the EMP assay method, was acquired from Galena (São Paulo, Brazil). Jardiance<sup>®</sup> tablets 25 mg (Lot 703725, Boehringer Ingelheim e Eli Lilly and Co., Germany) was acquired in the local commerce. The excipients used to prepare the extemporaneous formulations were obtained from the following suppliers: sodium carboxymethylcellulose (CMC), hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), methyl and propylparaben, propylene glycol,

glycerin and citric acid (Delaware, Porto Alegre, Brazil). Ultrapure water was purified by Megapurity Water Purification System. Reagents used in the EMP assay included: methanol (HPLC grade), supplied by Merck (Darmstadt, Germany), tris hydroxymethyl aminomethane (TRIS) (Proquímios, Rio de Janeiro, Brazil), sodium dodecyl sulfate (Neon, Suzano, Brazil), sodium hydroxide (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brazil), hydrogen peroxide and hydrochloric acid (Vetec Química Fina, Rio de Janeiro, Brazil). All chemicals and solvents were used as received.

## **2.2. Oral suspension preparation**

Previously the development of EMP oral suspension, the stability of the drug in a wide range of pH was evaluated by dispersing the powdered tablets in pharmacopeial buffers. The chosen buffers were acetate buffer pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0 and borate buffer pH 8.0 (BRASIL, 2010); the preparations (2 mg/mL) were stored at 25 °C and analyzed over 14 days.

EMP suspensions (2 mg/mL) were prepared from Jardiance 25 mg tablets and liquid vehicles using the standard mortar/pestle method. Eight tablets were crushed in a mortar until completely pulverized and the non-powdery coating parts were removed by sieving (250-micrometer mesh). The resulted powder was mixed with different suspending agent: 0.6% HPMC in formulation 1 (F1) and 0.5% CMC in formulation 2 (F2). Furthermore, 20% glycerin, methyl (0.1%, w/v) and propylparaben (0.02%, w/v) previously diluted in propylene glycol were added to both extemporaneous preparations. The pH of the formulations was adjusted to 6.5 with 0.1% citric acid and the volume was made up to 100 mL with purified water. Three batches of each suspension were prepared and stored in amber glass bottles, at 25 °C and assayed periodically over 0-60 days by a stability-indicating micellar electrokinetic chromatography (MEKC) method.

## **2.3 Instrumentation and analytical conditions**

The EMP assay was performed in an Agilent 7100 Capillary Electrophoresis Instrument (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipped with a photodiode array (PDA). Electrophoretic analysis was carried out in a fused-silica capillary of 50 µm internal diameter and 48.5 cm total length (40 cm of effective length), obtained from Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, USA). The analyses were made at 28 °C and detection at 225 nm. Sample injection was performed in hydrodynamic mode (50 mBar/4s) and a constant voltage of 28 kV was applied during analysis. The background electrolyte used was 10 mmol/L TRIS buffer (pH 10.0):50 mmol/L sodium dodecyl sulfate (1:1) (w/w).

#### **2.4 Preparation of standard and sample solution for EMP assay**

Empagliflozin standard solution was prepared by the dilution in methanol to 1000  $\mu\text{g/mL}$  and subsequent dilution in water, to get 200  $\mu\text{g/mL}$  and the internal standard (IS) acetaminophen (400  $\mu\text{g/mL}$ ) was prepared in water. These solutions were mixed in a 1:1 proportion, given a final concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$  of EMP and 200  $\mu\text{g/mL}$  of IS. To prepare the sample solutions, 2 mL of each oral suspension, equivalent to 4 mg of EMP, were diluted in 5 mL of methanol, sonicated for 10 minutes and then centrifuged (Sigma 2-16P) at 4000 rpm for 10 minutes. A 1.25 mL-portion of the supernatant was diluted in a 5 mL volumetric flask reaching a concentration of 200  $\mu\text{g/mL}$ . The final step followed the same procedure described for the standard solution, mixing the IS in the same proportion. The solutions were filtered through a 0.45  $\mu\text{m}$  nylon membrane filter before the analysis (Microlab Scientific Co. Ltd, Kowloon, Hong Kong).

#### **2.5 Method validation**

A stability-indicating MEKC previously validated in our laboratory to assay EMP tablets (BISCAINO, 2018) was revalidated (BRASIL, 2017; ICH 2005) to be applied to EMP suspensions, following the parameters of selectivity, accuracy and precision (BRASIL, 2017). The F1 was used to revalidation. Previous data indicated the linearity in the mL range of 50 to 150  $\mu\text{g/}$  (BISCAINO, 2018), then all the solutions assayed, including during the stability study, were within these concentrations.

The method selectivity was previously studied using forced degradation conditions under oxidative (3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 240 h), basic (2 M NaOH, 2 h), acid (1 M HCl, 5 h), photolytic (UV-A, 352 nm, 48 h) and thermal conditions (40  $^\circ\text{C}$ , 48 h). Empagliflozin was degraded in all the experimental conditions and additional peaks were observed just by use of radiation, being well resolved from empagliflozin peak (resolution  $> 2.0$ ). Besides, in all degradation conditions, the empagliflozin peaks present a peak purity index higher than 0.99, what indicate that co-migration with degradation products did not occurred and consequently, the method was specific (BISCAINO, 2018). In this study, placebo solutions were prepared in accordance with the suspension preparation procedure and analyzed using the developed method. The placebo contained the tablets excipients (lactose monohydrate, microcrystalline cellulose, hydroxypropylcellulose, croscarmellose sodium, silicon dioxide, magnesium stearate, hypromellose, titanium dioxide, talc, macrogol and yellow iron oxide) and the components used to obtain the oral suspension. Besides, in every sample run, the EMP peak

purity index was evaluated using the PDA detector and values higher than 0.9999 were considered acceptable (ICH, 2005).

The method accuracy applied to the suspensions was evaluated by recovery test (ICH, 2005). Sample solution containing fixed concentration of EMP and IS were spiked with known amounts of reference substance solution at three levels to obtain EMP final solutions containing 80, 100 and 120  $\mu\text{g/mL}$ , which corresponds to 80.0, 100.0 and 120.0% of the usual concentration (100  $\mu\text{g/mL}$ ). The difference between the results obtained from the unspiked sample solution should correspond to the amount of standard added to each spiked solution. The assay was performed in triplicate to each level and recovery values in the range of 98 and 102% of the target value were considered acceptable (SHABIR, 2003).

The precision was evaluated for repeatability and intermediate precision. For repeatability, six independent sample containing 100  $\mu\text{g/mL}$  of EMP and 200  $\mu\text{g/mL}$  of IS were prepared as described before by the same analyst. To evaluate the intermediate precision, six other independent samples were prepared by the same procedure, changing the day and the analyst. The EMP content in each sample was determined (%) and the relative standard deviation (RSD) between them was calculated. RSD values lower than 2.0% were considered acceptable (SHABIR, 2003).

## 2.6 Physico-chemical stability

The chemical stability of the suspensions (3 batches/formulation) stored at 25 °C was evaluated at zero time, 7, 14, 21, 25, 45 and 60 days after compounding. The bottles were well shaken before 2 mL sample was withdrawn to the analysis of EMP content by the MEKC method.

The stability study included the evaluation of the organoleptic characteristics, mean particle size, pH, volume of sedimentation and redispersion time during the storage time and the results were compared to on the ones of zero time.

The particle size measurement was performed in triplicate by laser diffraction (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd. (Malvern, UK). Mean diameter ( $d_{4,3}$ ) was automatically calculated and reported by the instrument. The measuring was carried out on days 0, 14, 25 and 60.

The pH of all formulations was measured without further dilution of each suspension using a calibrated potentiometer (CyberScan 510, Lennox, Dublin, Republic of Ireland), in triplicate, at zero time and on each sampling day.

The sedimentation volume (SV) was determined using 50 mL of each suspension. The ratio between the volume of sediment and the original volume of the suspensions was measured. Sedimentation height was evaluated after preparation of the formulations and at 7, 14, 21, 25, 45 and 60 days. The sedimentation volume was calculated using  $SV = V_f/V_0$ , where  $V_f$  is the final volume of sediment at equilibrium and  $V_0$  the total volume before sedimentation (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Redispersion was evaluated in the original tubes of each suspension (100 mL). The samples were manually vigorously shaken performing vertical movements of 180° to redistribute the sediment and the time taken for the suspension to redisperse completely was determined in seconds (s) (TAGLIARI, 2009). The measurements were carried out in triplicate for each formulation.

## **2.7 Microbiological stability**

The microbiological tests were performed according to the Brazilian Pharmacopoeia monograph of non-sterile products (BRASIL, 2010), using soybean-casein digest agar (for total aerobic bacteria count) and Sabouraud dextrose agar medium (for total molds and yeasts count). The oral suspensions were diluted with peptone solution containing 3% polysorbate 80 (to inactivate the parabens), aiming to obtain  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$  dilutions. One milliliter of each dilution was transferred to sterile petri dishes and then 15 mL of the respective sterile and cooled to 45 °C media were added. After solidification, the plates were inverted and incubated for 2-4 days at 35 °C (bacteria count) or for 5-7 days at 25 °C (molds and yeasts count). After incubation, the number of colonies was counted and the result expressed as the number of microorganism per mL of the product. This analysis was performed at days 0, 25 and 60.

## **2.7 Statistical analysis**

Data of stability studies were statistically analyzed by ANOVA and post-hoc test Tukey for comparisons of groups of data. The level of significance was set at 95% ( $p < 0.05$ ) using RStudio® Software.

# **3 Results and discussion**

## **3.1 Preliminary studies**

The formulation development started by the evaluation of the EMP stability under different pH values. It was observed that in the pH range of 5.0 to 7.0 the stability of the EMP was maintained ( $p > 0.05$ ) during 14 days (Figure 1), while fast decrease in content occurred in the range of 2.0 to 4.0 ( $p < 0.05$ ). Considering that parabens are subject to hydrolysis in aqueous solution in pH values higher than 8.0 (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009) and that pH values greater than 7.0 increase the possibility of microbial growth (AULTON, 2016), we decided to adjust the formulation pH value to 5.0 to 7.0, which is in accordance to the parabens stability and to the administration route. By using citric acid for the pH adjustment to  $6.5 \pm 0.1$ , good results were obtained over 14 days of storage at 25 °C (results not shown).

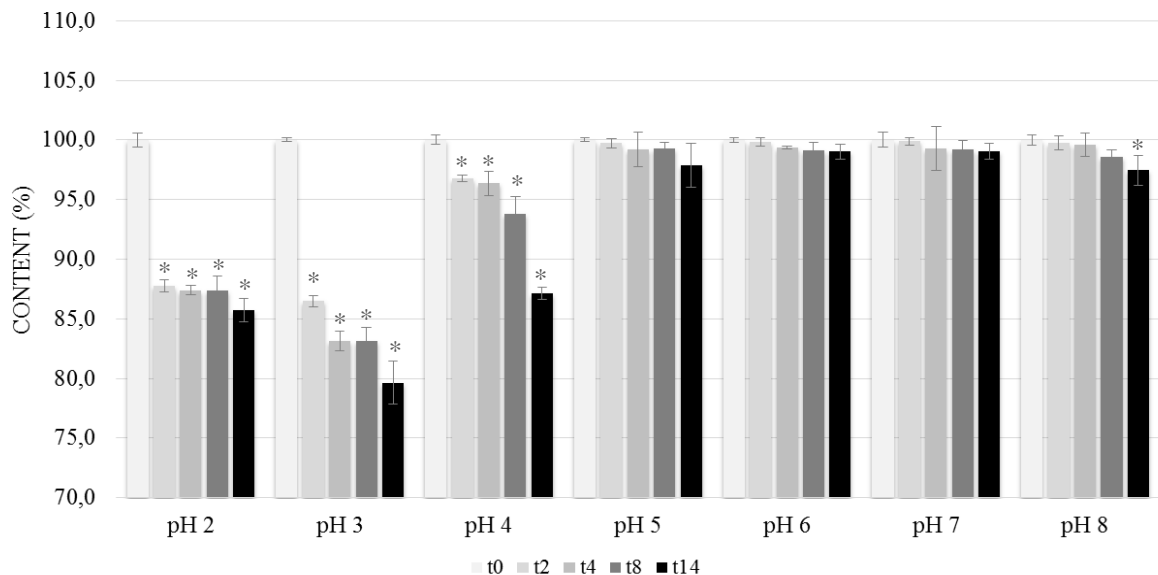


Figure 1: EMP residual values in buffers of pH range from 2.0 at 8.0, evaluated at zero time, 2, 4, 8 and 14 day after compounding.

\* $p < 0.05$

The powdered tablets presented no uniform particle size related to the non-powdery coating fragments. To evaluate this effect, oral suspensions were prepared with or without to sieve the tablets powder. Without sieving, sedimentation began immediately after resting of the samples. The mean particle size was about 140  $\mu\text{m}$  and the spam value of 4.23 indicated a high size variation of the particles. After sieving the tablets powder, it was verified a reduction in the sedimentation rate and in the mean particle size to 86  $\mu\text{m}$ . Also, the spam value also decreased to 2.90, indicating better homogeneity of the particles in the formulation. Therefore, the sieving process was added as preliminary step of the suspension preparation.

### 3.2 Method validation

The specificity was the first parameter checked and no interference between the peak of EMP and any other peaks occurred, as shown by a typical electropherogram of the analysis (Figure 2). Besides, the peak purity index  $> 0.9999$ , which was measured in all analyses, also confirmed the method specificity.

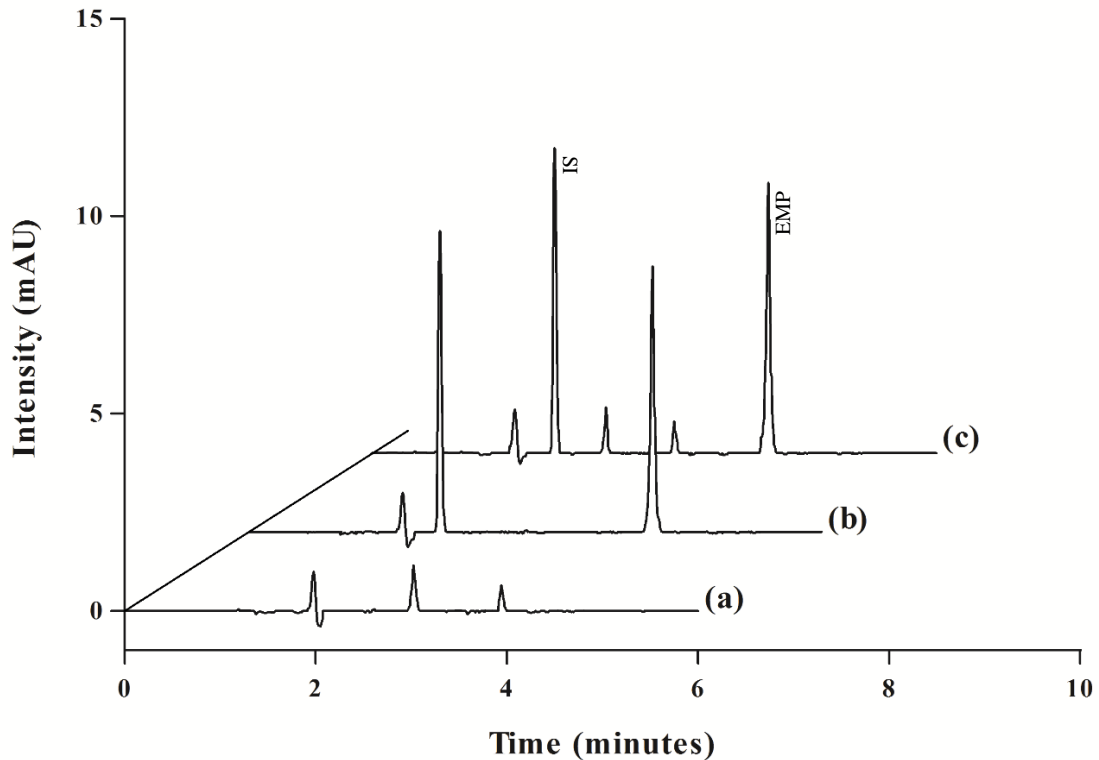


Figure 2: Electropherograms of placebo (a), standard (b) and sample (c).  
IS: internal standard. EMP: empagliflozin

The accuracy of the results was calculated using the % recovery of EMP for three different concentrations. All the independent recovery values as well as the mean recovery of EMP (99.35%,  $n=9$ ) met the acceptable range of 98.0 to 102.0% (Table 1) (SHABIR, 2003).

The precision of the method was confirmed by the RSD values  $< 2.0\%$ , calculated from the intra-day assay values ( $100.42\% \pm 0.51$ , RSD=1.25%, analyst A, day 1,  $n=6$ ) and from the intermediate precision assay values ( $99.76\% \pm 0.48$ , RSD=1.17%, analyst B, day 2,  $n=6$ ). These results also indicated that the EMP mean of the assay ( $100.22 \pm 0.34$ , RSD=1.15%,  $n=12$ ) met the most used compendial limits.

These evaluations indicated that no modification in any analytical condition of the previously developed MEKC method was necessary because the validation parameters were within the acceptable limits.

Table 1: Results obtained to accuracy using the proposed EC method.

Level (%)	Concentration added ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)	Mean <sup>a</sup> (%) $\pm$ SD	RSD %
<b>80</b>	30.0	29.77	99.25	98.80 $\pm$ 0.26	0.45
		29.64	98.79		
		29.50	98.35		
<b>100</b>	50.0	49.76	99.52	99.26 $\pm$ 0.51	0.90
		49.99	99.98		
		49.04	98.26		
<b>120</b>	70.0	69.67	99.53	99.98 $\pm$ 0.88	1.52
		69.11	98.73		
		71.17	101.68		
<b>Mean<sup>b</sup> (%) <math>\pm</math> SD</b>				<b>99.35 <math>\pm</math> 0.34</b>	<b>1.04</b>

<sup>a</sup>(n=3)/level; <sup>b</sup>(n=9)

### 3.3 Stability evaluation

The results of the physico-chemical characteristics of the oral suspensions are presented in Table 2 and Table 3. Macroscopically, there were no detectable changes in color and odor in the samples during 60 days of storage. Chemical stability was defined as keeping more than 95% of the initial EMP value and the data of pH, particle size and sedimentation volume were compared to the t<sub>0</sub> values ( $\alpha=0.05$ ).



Table 2: Physico-chemical stability of F1, stored at 25 °C over 60 days.

<b>Time (days)</b>	<b>Content (%)</b>	<b>pH</b>	<b>Particle Size (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Sedimentation Volume</b>	<b>Redispersion (s)</b>
<b>0</b>	100.69 $\pm$ 1.02	6.54 $\pm$ 0.03	80.60 $\pm$ 1.27	0.067 $\pm$ 0.003	20
<b>7</b>	100.43 $\pm$ 1.12	6.51 $\pm$ 0.03	-	0.067 $\pm$ 0.003	25
<b>14</b>	99.48 $\pm$ 1.04	6.55 $\pm$ 0.03	80.93 $\pm$ 0.77	0.063 $\pm$ 0.003	30
<b>21</b>	98.48 $\pm$ 1.14	6.56 $\pm$ 0.02	-	0.063 $\pm$ 0.003	45
<b>25</b>	97.97 $\pm$ 1.12	6.52 $\pm$ 0.13	82.50 $\pm$ 1.51	0.063 $\pm$ 0.003	50
<b>45</b>	92.52 $\pm$ 1.09	6.54 $\pm$ 0.07	-	0.063 $\pm$ 0.003	>60
<b>60</b>	84.80 $\pm$ 1.23	6.52 $\pm$ 0.33	82.40 $\pm$ 1.21	0.063 $\pm$ 0.003	>60

Table 3: Physico-chemical stability of F2 stored at 25 °C over 60 days.

<b>Time (days)</b>	<b>Content (%)</b>	<b>pH</b>	<b>Particle Size (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Sedimentation Volume</b>	<b>Redispersion (s)</b>
<b>0</b>	101.72 $\pm$ 0.75	6.51 $\pm$ 0.02	103.33 $\pm$ 0.88	0.317 $\pm$ 0.012	10
<b>7</b>	101.61 $\pm$ 0.64	6.50 $\pm$ 0.05	-	0.310 $\pm$ 0.019	15
<b>14</b>	101.06 $\pm$ 0.71	6.52 $\pm$ 0.02	104.00 $\pm$ 0.57	0.310 $\pm$ 0.015	20
<b>21</b>	100.39 $\pm$ 1.42	6.52 $\pm$ 0.03	-	0.310 $\pm$ 0.012	20
<b>25</b>	99.92 $\pm$ 1.20	6.53 $\pm$ 0.02	104.33 $\pm$ 0.67	0.307 $\pm$ 0.003	25
<b>45</b>	96.18 $\pm$ 1.29	6.51 $\pm$ 0.03	-	0.307 $\pm$ 0.012	25
<b>60</b>	90.42 $\pm$ 0.68	6.51 $\pm$ 0.04	105.00 $\pm$ 0.58	0.307 $\pm$ 0.003	25

The EMP content was greater than 95% over 25 days and 45 days for F1 and F2, respectively. The pH of both formulations was around 6.5, which is the optimum pH of EMP stability as observed in the preliminary studies and remained constant during the study ( $p > 0.05$ ).

The control of particle sedimentation is necessary to ensure the uniform dosage for any pharmaceutical suspension. Polymers have been widely used as suspending agents and to ensure adequate viscosity (FLORENCE; ATTWOOD, 2003). The sedimentation volume of F1 was smaller than F2 that could be related to the polymeric materials used in each formulation. According to the results of Table 3, the sediment volume of the F2 was 0.31, characterizing a flocculated system ( $< 0.1$  and  $< 0.6$ ), where the particles are arranged in loose aggregates, with rapid sedimentation and easy redispersion (AULTON, 2016). The

redispersion value corroborated this theory since it was higher for F1 due to the formation of a compact sediment when compared to F2. This effect can be related to the decrease in EMP content observed for F1.

Another parameter that can influence sedimentation and compromise the suspensions redispersion is the particle size. Particle size distribution affects the rate of dissolution, bioavailability, dose uniformity and organoleptic appearance of the formulations (ALLEN; POPOVICH; ANSEL, 2007). The F2 formulations exhibited mean particle size around 100  $\mu\text{m}$  while F1 presented smaller particle size. This is probably due to the flocculation promoted by the ionic polymer CMC. Even so, this characteristic did not change over the 60-day period, for both formulations ( $p > 0.05$ ).

### **3.4 Microbiological stability**

The growth of microorganisms is favored in liquid formulations due to the presence of water and organic compounds. The presence of microorganisms in pharmaceutical products can modify the stability of formulations by degradation of drug substance, active pharmaceutical, organoleptic changes and damages to consumer health (ORTH, 2007). The preservative and the correct amount to be added is an important item to be determined. An amount below the minimum inhibitory concentration may favor contamination, on the other hand, an excess of dose may be toxic and cause side effects to consumers, such as irritation or even tumor induction (CAON et al, 2010; HARVEY; EVERETT, 2004). Parabens are one of the most widely used preservatives in food, cosmetics and pharmaceutical products and they present a broad spectrum of antimicrobial activity, chemical stability over a broad pH range and low cost (TAGLIARI, 2009). The allowed concentration for oral formulations is 0.015-0.2% methylparaben and 0.01-0.02% propylparaben (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). In this study, they were at 0.1% and 0.02%, respectively.

The microbiological evaluation was performed by analyzing the formulations after 0, 25 and 60 days according to the monograph of the Brazilian Pharmacopoeia of non-sterile products that establishes microbial limits  $10^1$  cfu  $\text{mL}^{-1}$  (fungi) and  $10^2$  cfu  $\text{mL}^{-1}$  (bacteria). Until t25 the microbial growth observed met the pharmacopoeial limits; however, at t60 it was over the compendial limit for both formulations.

## 4 Conclusions

This study showed the technical feasibility of the production of empagliflozin suspensions from tablets. F1 presented characteristics closer to a deflocculated suspension with a longer redispersion time, while the data suggest that F2 could be characterized as a flocculated suspension having its redispersion facilitated. F2 showed better physico-chemical stability than F1, however, the microbiological data limited the use of both for 25 days. Taking these results into account, these EMP formulations should be considered suitable for patients with difficulty in swallowing for hospital use.

## References

- ALLEN JR., L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. 8. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2007.
- AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas, 4ª ed., Elsevier; Rio de Janeiro, 2016.
- BERNAL, N. P. et al. Development, physical-chemical stability, and release studies of four alcohol-free spironolactone suspension for use in pediatrics. *Dissolution Technologies*, n. 2, p. 19–30, 2014.
- BISCAINO, P.T.; Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de comprimidos de empagliflozina e estudo preliminar de estabilidade. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2018.
- BONACUCINA, G. et al. Chemical and microbiological stability studies of an aqueous solution of pravastatin sodium salt for drug therapy of the dysphagic patients. *European Journal of Hospital Pharmacy*, v. 23, n. 5, p. 288–293, 2016.
- BRASIL – Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 5 ed, v 2, Brasília: Anvisa, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE no 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. 2017.
- CAON, T.; COSTA, A.C.O.; OLIVEIRA, M.A.L.; MICKE, G.A.; SIMÕES, C.M.O. Evaluation of the transdermal permeation of different paraben combinations through a pig ear skin model. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 391, p. 1-6, 2010.
- EMPAGLIFLOZINA. BULA Alemanha. Boehringer Ingelheim, 2015.
- FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. Princípios físico-químicos em farmácia. 3. ed. São Paulo: EDUSP, 2003.
- FRIEDRICH, C. et al. A Randomized, Open-Label, Crossover Study to Evaluate the Pharmacokinetics of Empagliflozin and Linagliptin After Coadministration in Healthy Male Volunteers. *Clinical Therapeutics*, v. 35, n. 1, p. A33–A42, 2013.
- GLASS, B. D.; HAYWOOD, A. Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 9, n. 3, p. 398–426, 2006.
- GREMLER, R. et al. Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterization and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 14, n. 1, p. 83–90, 2012.

- HARVEY, PW; EVERETT, DJ. Significance of the detection of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens) in humans breast tumors. *Journal of Applied Toxicology*. Vol 24, Issue 1, pages 1-4, 2004.
- HAYWOOD, A.; GLASS, B. D. Liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products – considering new evidence on stability. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, v. 16, n. 3, p. 441 - 455, 2013.
- HEISE, T. et al. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Multiple Rising Doses of Empagliflozin in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Therapy*, v. 4, n. 2, p. 331–345, 2013.
- ICH. HARMONISED TRIPARTITE. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q2 (R1): Guideline on Validation of Analytical Procedure – Methodology, 2005.
- IDF. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 8<sup>th</sup> ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2018.
- LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. *Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica*. vol. 2. Lisboa: Calouste Gulbekian Foundation, 2001.
- MACHA, S. et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of empagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor, in subjects with renal impairment. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 16, n. 3, p. 215–222, 2014.
- NISSEN, L. M.; HAYWOOD, A.; STEADMAN, K. J. Solid medication dosage form modification at the bedside and in the pharmacy of Queensland Hospitals. *Journal of Pharmacy Practice and Research*, v. 39, n. 2, p. 129–134, 2009.
- ORTH, DS. Principles of Preservation. Denyer SP Bainrd RM. In: *Guide to microbiological Control in Pharmaceutics and Medical Devices*. Second Edition. Boca Raton, London, New York: CRC Press, p. 309-321, 2007.
- PABARI, R. M. et al. Stability of an Alternative Extemporaneous Captopril Fast-Dispersing Tablet Formulation Versus an Extemporaneous Oral Liquid Formulation. *Clinical Therapeutics*, v. 34, n. 11, p. 2221–2229, 2012.
- ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. editors. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6th ed. London: Pharmaceutical Press; 2009.
- SEMAN, L. et al. Empagliflozin (BI 10773), a Potent and Selective SGLT2 Inhibitor, Induces Dose-Dependent Glucosuria in Healthy Subjects. *Clinical Pharmacology in Drug Development*, v. 2, n. 2, p. 152–161, 2013.
- SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US food and drug administration, the US pharmacopeia and the international conference. *Journal of Chromatography A*, v. 987, n. 1, p. 57-66, 2003
- STORPIRTIS, S. et al. *Ciências Farmacêuticas: Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica*. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 18, p. 171-181, 2011.
- TAGLIARI, M. P. et al. Evaluation of physicochemical characteristics of suspensions containing hydrochlorothiazide developed for pediatric use. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 28, n. 5, p. 734–740, 2009.
- VENTURA, D. M. Desenvolvimento farmacotécnico de formulações de suspensões de hidroclorotiazida obtidas por transformação de formas farmacêuticas. [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2011.
- ZAID, A. N. et al. Stability of extemporaneously prepared rosuvastatin oral suspension. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 74, n. 19, p. 1579-1583, 2017.
- ZINMAN, B. et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 22, p. 2117–2128, 2015.

**CAPÍTULO II – Development of a liquid chromatographic method to assay empagliflozin and identification of the major photoproduct by quadrupole-time of flight mass spectrometry**

---

## 5.1 Apresentação

Neste capítulo um método simples de HPLC-UV indicativo de estabilidade foi desenvolvido para o doseamento da empagliflozina em comprimidos. A fase móvel foi otimizada por delineamento fatorial completo  $2^3$  e os parâmetros cromatográficos foram avaliados de acordo com as especificações. Para o estudo da degradação forçada, o padrão de empagliflozina e os comprimidos foram expostos sob condições de estresse a fim de avaliar a estabilidade intrínseca da molécula. Um produto de degradação formado após exposição do fármaco sob a radiação UVC. Seu isolamento ocorreu por cromatografia semi-preparativa e analisado por espectrometria de alta resolução (HRMS). A estrutura do PD<sub>UVC</sub> foi sugerida e uma rota envolvida na degradação fotolítica da empagliflozina foi proposta.

## **Development of a liquid chromatographic method to assay empagliflozin and identification of the major photoproduct by quadrupole-time of flight mass spectrometry**

Suelen Leticia Burin<sup>1</sup>, Rebeca Lino Lourenço<sup>2</sup>, Morgana Doneda<sup>3</sup>, Edson Irineu Müller<sup>3</sup>, Andréa Inês Horn Adams<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Post-graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>2</sup> Industrial Pharmacy Department, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>3</sup> Chemistry Department, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

Address all correspondence to Prof. Dr. Andréa I. H. Adams. Federal University of Santa Maria – UFSM. Av. Roraima, 1000. Santa Maria/RS - CEP 97105-900. Tel.: +55 55 3220 8661

E-mail: [andrea.ih.adams@gmail.com](mailto:andrea.ih.adams@gmail.com)

**Abstract:** Diabetes is a set of metabolic disorders and affects more than 400 million individuals worldwide. Type 2 diabetes is characterized by incapacity in insulin action and secretion and in the regulation of hepatic glucose production. Empagliflozin belongs to the gliflozines class that are drugs used by oral route to the treatment of type 2 diabetes. In this study, a simple stability-indicating HPLC-UV method was developed to assay empagliflozin and its major photoproduct was identified by high resolution mass spectrometry (HRMS). The mobile phase was optimized by CCD and was composed of methanol, acetonitrile and purified water (60:5:35 v/v), at a flow rate of 1 mL/min. Calibration curve was linear in the range of 5 to 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The method showed to be precise, accurate and robust. For forced degradation study, empagliflozin standard and tablets were exposed under stress conditions. A degradation product formed after drug exposure to UVC radiation was isolated and analyzed by quadrupole-time of flight mass spectrometry. The structure of PD<sub>UVC</sub> was suggested and the route involved in the photolytic degradation of empagliflozin was proposed.

**Keywords:** stability-indicating, degradation product, route degradation, photostability

## 1 Introduction

Diabetes is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia and is a significant risk factor for cardiovascular disease (GALLO, 2015; WHALEN, 2015). Empagliflozin (chemical name (1S)-1,5-Anhydro-1-C-[4-chloro-3-[[4-[[[(3S)-tetrahydro-3-furanyl]oxy]phenyl]methyl]phenyl]-d-glucitol), is the first drug of the gliflozin class, a novel approach for the treatment of type 2 diabetes. This drug blocks selectively the sodium-glucose reabsorption cotransporter 2 (SGLT2) in addition to the reduction of cardiovascular risks associated to type 2 diabetes (WILDING, 2009; ZINMAN, 2015). Empagliflozin has a 2500-fold greater selectivity for SGLT2 receptors (present exclusively in the kidneys) compared to SGLT1 receptors (present in the kidneys and intestine). Therefore, it has the advantage of presenting fewer gastrointestinal side effects than the other gliflozines (WHALEN 2015; GREMLER, 2012; GERICH, 2010). Empagliflozin was approved by FDA in 2014 and is available as coated tablets containing 10 and 25 mg (Jardiance<sup>®</sup>) (EMPAGLIFLOZINA, 2015).

So far, no methods to assay empagliflozin as bulk or tablets have been reported in compendial monographs. In literature there are reported some HPLC-MS/MS methods to assay empagliflozin in plasma (FRIEDRICH, 2013; HEISE, 2013). To assay the drug as bulk or as drug product, as monotherapy or in combination with other drugs, there are reported UV method (AYOUB, 2016, AYOUB, 2017, PADMJA, VEERABHADRAM, 2016), HPLC-UV method (PADMAKA; VEERABHADRAM, 2016, SHYAMALA et al, 2016, SWARUPA et al, 2016), HPLC-MS/MS (ZHOU, 2016), UPLC-UV method (AYOUB, 2015, GOPAL; SRIDHAR, 2017) and UPLC-MS/MS method (ABDEL-GHANY et al, 2016, AYOUB; MOWAKA, 2017). However, several of them present buffer in their mobile phase, which can damage the chromatographic system due to precipitation of salts or are not stability-indicative method.

In recent years, the studies about degradation products (DP) associated with rapid and sensitive methods increased in pharmaceutical analysis motivated by the guidelines of regulatory agencies (ICH, 2006; BRASIL, 2015). Chromatography is one of the most commonly used techniques in the pharmaceutical analysis for bulk and products analysis and has advantages such as sensitivity, robustness, capacity detection and versatility (LEITE, 2009; NARAYANAM, 2013). The qualification and quantification of DP have been studied not only for approval but also because of their importance in toxicological safety (LEITE, 2009).



Several degradation conditions have been used in the reported methods and demonstrated the empagliflozin susceptibility to alkaline and oxidative media, photolytic and thermal exposure (SWARUPA et al., 2016; SYAMALA et al., 2016; GOPAL; SRIDHAR, 2017). However, up to the moment there are no reports about the identification of empagliflozin degradation products obtained from the drug photolysis.

Currently, spectra obtained by high resolution mass spectrometry allow the identification and characterization of DPs. Among the mass detectors, the quadrupole flight time detector (Q-ToF) has advantages such as sensitivity and high resolution (LEITE, 2009; NARAYANAM, 2013).

Thus, the aim of this study was to develop and validate a fast, simple and efficient HPLC method to assay empagliflozin tablets as well as to perform a study of stability under different conditions of forced degradation. Furthermore, to identify the major degradation product resulted from the radiation exposure and to propose its degradation route.

## **2 Materials and methods**

### **2.1 Chemicals and reagents**

Empagliflozin (EMP) standard (99.77%, CAS 864070-44-0, Lot E160597L) was purchase from Triplebond® (Guelph Ontario, Canada). Jardiance® tablets 25 mg (Boehringer Ingelheim e Eli Lilly and Co., Germany) were acquired in the local market. The tablets excipients (lactose monohydrate, microcrystalline cellulose, hyplose, croscarmellose sodium, silicium dioxide, magnesium stearate, hypromellose, titanium dioxide, talc, macrogol and yellow iron oxide) was acquired from Delaware (Porto Alegre, Brazil). Hydrochloric acid and hydrogen peroxide from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil), sodium hydroxide from Dinâmica (São Paulo, Brazil), copper sulphate from Merck (Darmstadt, Germany), methanol HPLC grade were purchased from Tedia (Fairfield, USA), acetonitrile HPLC grade were obtained from J.T. Baker Chemicals (Pennsylvania, USA). MS grade acetonitrile was obtained from LiChrosolv Merck (Darmstadt, Germany) and MS grade formic acid from Sigma Aldrich (São Paulo, Brazil). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q water purification system (Milli-Q Gradient System, Millipore Corp., USA) and was used for all analyses.

## 2.2 Standard and samples solutions

Standard stock solution of EMP (500  $\mu\text{g/mL}$ ) was prepared by dissolving 10 mg in 20 mL of methanol. Afterwards, 1 mL of stock solution was diluted in 10 mL of purified water, obtaining the final concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$ .

Sample stock solution of was prepared by dissolving a quantity of the powdered tablets equivalent to 10 mg of EMP in 20 mL of methanol, sonicated for 10 minutes and then centrifugated at 4000 rpm for 10 minutes. One milliliter of the supernatant was diluted in 10 mL of purified water obtaining the final solution at 50  $\mu\text{g/mL}$ .

## 2.3 Apparatus and analytical conditions

Experiments related to the method validation and the degradation product (DP) isolation were performed on a Shimadzu Prominence HPLC System (Kyoto, Japan) equipped with a CBM-20A system controller, SIL-20A auto injector, LC-20AT pump, DGU-20AT degasser and SPD-M20A PDA detector. The assay method was performed on a Zorbax Eclipse Plus Agilent<sup>®</sup> (Santa Clara, CA, USA) C18 column (250  $\times$  10 mm i.d., particle size 10  $\mu\text{m}$ ). The mobile phase was composed by methanol, acetonitrile and purified water (60:5:35 v/v), in a flow rate of 1 mL/min, UV detection at 225 nm and injection volume was 20  $\mu\text{L}$ . The chromatographic conditions established for isolation of DP were semi-preparative Luna Phenomenex (Phenomenex, USA) C18 column (250  $\times$  10 mm i.d., particle size 10  $\mu\text{m}$ ), mobile phase composed by methanol and purified water (60:40 v/v), flow rate of 2 mL/min, detection at 225 nm and injection volume of 100  $\mu\text{L}$ .

High resolution mass spectrometry (HRMS) was carried out in full-scan mode and MS/MS mode was used to obtain the fragments of the selected ion. HRMS analyses were carried out on a quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer (XEVO G2 Q-TOF, Waters, Milford, USA). The samples were diluted in a mixture of ultrapure water and acetonitrile (1:1) with 0.1% of formic acid and analyzed by direct infusion into the electrospray ion source in positive mode (ESI+). The MassLynx V 4.1 software was used for data acquisition and analysis. The ion source parameters were: capillary 2.52 kV, cone 11 V, extractor cone 3.00 kV, source temperature 150  $^{\circ}\text{C}$ , desolvation temperature 400  $^{\circ}\text{C}$ , cone gas flow rate 10 L/h and desolvation gas flow rate 400 L/h.

## 2.4 Experimental design and statistical analysis

In order to optimize the chromatographic conditions, a Central Composite Design (CCD) was performed on Minitab<sup>®</sup> 17 software (Minitab Inc., State College, PA, USA), by

using a complete factorial  $2^3$ , including 8 cube points, 6 axial points and 6 center points totalizing 20 runs. The composition of mobile phase (% methanol, % acetonitrile and the water pH adjustment) was optimized using the response surface methodology (RSM). The experimental response was evaluated in terms of the chromatographic parameters: resolution (R), theoretical plates (N), asymmetry (A), capacity factor ( $K'$ ) and retention time (Rt). The values used in the experimental design are shown in table 1.

Table 1: Values used in the CCD for three factors.

Independents Factors	Code	Levels				
		$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
% metanol	$x_1$	51.59	55	60	65	68.40
% acetonitrile	$x_2$	-0.37	1.5	4.25	7.0	8.87
Water pH	$x_3$	2.98	4.0	5.5	7.0	8.02

$\alpha = 1.682$

## 2.5 Method validation

The following analytical parameters were evaluated: specificity, linearity, limits of detection and quantification, precision, accuracy and robustness in accordance to the guidelines (BRASIL, 2017; ICH, 2005).

### 2.5.1 Specificity and forced degradation studies

The method specificity was evaluated by stress testing and by the placebo analysis, to determine if the degradation products or the formulation components could interfere in the assay. Placebo was prepared mixing the excipients present in the tablets in amounts usually employed in tablets (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009), and then diluted with the same procedure used to prepare the sample (section 2.2).

The stress testing was performed exposing a standard solution (500  $\mu\text{g/mL}$ ) and a sample solution from Jardiance<sup>®</sup> tablets (500  $\mu\text{g/mL}$ ) to acidic, alkaline and neutral hydrolysis, metal ions, heat, photolysis and oxidation. To promote acidic and alkaline hydrolysis, 2 mL of EMP sample solutions were mixed with 2 mL of 1 M HCl or 2 M NaOH and remained at room temperature, under light protection. At the end of degradation treatment, the mixtures were neutralized. For the oxidative degradation, 2 mL of the EMP sample solution were mixed with 2 mL of 30% hydrogen peroxide, and remained protected

from the light and at room temperature. Degradation by metal ions was performed by mixing 2 mL of EMP sample solution and 2 mL of 0.01 M CuSO<sub>4</sub> solution. For thermal degradation, 2 mL of EMP sample solution were exposed to heat (60 °C) in a sealed glass container inside an oven. The effect of the association of temperature and humidity was evaluated keeping the samples in an environment with 40 ± 2°C/75% relative humidity. For photodegradation, one milliliter of sample solution was exposed to UV-A 30 minutes, equivalent to 3460 Wh/m<sup>2</sup>, and UV-C radiation during 3 hours. The lamp energy was determined with UV measurement equipment (model GUVV-T10S7-L, Genuine UV Technology, Daejeon, Korea). At the end of all the degradation treatments, the solutions were diluted to theoretical concentration of 50 µg/mL with purified water as described in Section 2.2. The stability-indicating capability of the method was demonstrated by the peak purity of EMP in the degraded samples using the PDA detector.

### 2.5.2 Linearity

Linearity was evaluated at seven concentration levels of EMP standard in the range of 5 µg/mL to 150 µg/mL. The standard curves were obtained by plotting area versus concentration. The method of least square regression and analysis of variance was used to determine the linearity of the method ( $\alpha = 0.05$ ).

### 2.5.3 Limit of detection (LOD) and quantification (LOQ)

The values of LOD and LOQ were estimated based on the standard deviation of the y-axis intercepts of regression analysis ( $\sigma$ ) and the mean slope ( $\alpha$ ) and were calculated from the following formula:  $LOD = 3.3(\sigma/\alpha)$  and  $LOQ = 10(\sigma/\alpha)$ , all obtained from three independent curves (ICH, 2005). Solutions of the standard containing the concentration of LOQ and LOD calculated by the equations were prepared and analyzed, aiming to confirm the ability of the method to detect that low concentration.

### 2.5.4 Precision

The precision was evaluated for repeatability and intermediate precision. Six independent samples containing 50 µg/mL of EMP were prepared as described in Section 2.2 by the same analyst (repeatability). To evaluate the intermediate precision, six other independent samples were prepared by the same procedure, changing the day and the analyst. The EMP content in each sample was determined (%) and the relative standard deviation

(RSD) between them was calculated. RSD values lower than 2.0% were considered acceptable (SHABIR, 2003).

### **2.5.5 Accuracy**

Accuracy was determined by adding known amounts of EMP standard to samples at the beginning of the process in three levels which were equivalent to 80, 100 and 120% of working concentration, i.e., dilutions were made to achieve final concentrations of 30, 50 and 70  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. This procedure was performed in triplicate to each level. The difference between the results obtained from the unspiked sample solution should correspond to the amount of drug added in each case. Recovery values in the range of 98 and 102% of the target value were considered acceptable (SHABIR, 2003).

### **2.5.6 Robustness**

In order to establish the effect of analysis variations in the method, modifications in the optimized condition were made, including the proportion of methanol in the mobile phase, flow and column. A sample solution at the working concentration was analyzed in all the conditions evaluated and the RSD value was calculated. The effect over tailing factor, theoretical plates and capacity factor were also evaluated.

## **2.6 EMP photolytic degradation and isolation of the photoproduct**

EMP degradation product was obtained by exposing 1 mL of standard solution (5000  $\mu\text{g/mL}$ ) for 3h to a UV-C light. Solutions were contained in a covered transparent container (Brand, Wertheim, Germany). Samples protect from light (dark control) were also prepared to evaluate the contribution of thermal induced changes. EMP degradation product was isolated using the semi-preparative LC conditions, described in Section 2.3. The fraction of DP was collected manually, analyzed by the HPLC method in order to check its purity and then it was identified by HRMS.

## **3 Results and discussion**

### **3.1 Method optimization**

Factorial design is a tool to measure simultaneously the effects of analytical conditions in different level combinations on a response value. The Central Composite Design (CCD)

aims to define the ideal conditions during the development of the method making it simple, fast and efficient (HIBBERT, 2012; KHAMANGA, 2011). Preliminary studies indicated that in the experimental conditions EMP degradation products would be detected after exposure to radiation. Therefore, the method was optimized by CCD using empagliflozin sample solution degraded under exposure to UV-C radiation. In order to obtain good resolution between the drug and the degradation product, as well as adequate retention time values for subsequent isolation of the degradation product. The adjustment of the water pH was another factor evaluated because several methods previously reported employed acidified water or buffers, usually with pH close to 4.0 (ABDEL-GHANY; AYAD; TADROS, 2018; AYOUB, 2015; GOPAL; SRIDHAR, 2017; SWARUPA et al, 2016). In this optimization, the pH value ranged from 3.0 to 8.0.

Table 2 present the values used on the complete factorial  $2^3$  and the chromatographic parameters evaluated that included the resolution between EMP signal and DP signal, theoretical plates, asymmetry, capacity factor, and retention time of empagliflozin peak.

Table 2: Coded values and responses for resolution (R), theoretical plates (N), asymmetry (A), capacity factor ( $K'$ ) and retention time (Rt).

Run	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	R	N	A	K'	Rt
1	+1	-1	-1	8.41	7126	1.18	1.28	6.67
2	0	0	0	9.49	7565	1.15	3.01	7.72
3	+1	-1	+1	8.39	7067	1.19	2.26	6.71
4	0	0	-1.682	9.56	7694	1.15	2.25	7.87
5	-1	+1	-1	10.91	8251	1.13	2.43	9.03
6	0	0	0	9.47	7677	1.16	2.80	7.76
7	-1	-1	-1	8.74	9297	1.10	6.77	15.47
8	+1	+1	+1	5.52	6814	1.25	1.23	4.78
9	-1	+1	+1	10.84	8484	1.14	3.40	8.84
10	0	-1.682	0	12.93	8416	1.12	4.52	11.84
11	0	0	+1.682	9.49	7797	1.16	2.31	7.69
12	0	+1.682	0	6.81	7282	1.21	2.30	5.49

13	0	0	0	9.42	7686	1.16	2.86	7.68
14	-1.682	0	0	13.96	9699	1.10	7.20	16.20
15	0	0	0	9.52	7735	1.16	2.87	7.74
16	0	0	0	9.41	7701	1.16	2.82	7.65
17	+1.682	0	0	6.02	8726	1.18	1.34	4.98
18	-1	-1	+1	9.02	9006	1.10	5.77	15.75
19	+1	+1	-1	5.79	7326	1.23	0.75	4.87
20	0	0	0	9.36	7626	1.17	2.71	7.69

$x_1$  = % methanol;  $x_2$  = % acetonitrile;  $x_3$  = water pH adjustment

According to the conditions used in the optimization method, the EMP retention time ranged from 4.78 to 16.2, and all conditions provided good resolution ( $R > 2$ ) between the EMP and PD signals. Suitable values of theoretical plates ( $N > 2000$ ) and asymmetry ( $A < 2$ ) also were reached in all conditions of analysis (USP 39, 2016). However, four conditions (Run 1, 8, 17 and 19) presented factor capacity values lower than the specification ( $K > 2$ ) (USP 39, 2016) indicating that higher levels of organic solvents decrease the factor capacity, by decreasing the EMP interaction with the column.

In order to determine the significance ( $p < 0.05$ ) of the experimental variables on the performance of the CCD, an analysis of variance (ANOVA) was performed and the results are presented in Table 3. All chromatographic parameters monitored were significantly affected by the organic components ( $x_1$  and  $x_2$ ) of the mobile phase alone or by their combinations. It should be emphasized that the variable  $x_3$  (water pH) did not presented significant effect ( $p > 0.05$ ) over any analytical parameter and then its results are not presented. Thus, it can be stated that the pH of the aqueous phase does not interfere in the EMP quantitation in the range evaluated and no special care should be taken during the analysis about it.

Table 3: ANOVA results for CCD at 5% level of significance.

Factors	P-value				
	R	N	A	K'	Rt
x <sub>1</sub>	0.002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
x <sub>2</sub>	0.037	0.043	0.0001	0.0001	0.0001
x <sub>1</sub> * x <sub>1</sub>	NS	0.002	NS	0.003	0.0001
x <sub>2</sub> * x <sub>2</sub>	NS	NS	NS	NS	0.0001
x <sub>1</sub> * x <sub>2</sub>	0.003	NS	NS	0.02	0.0001
R <sup>2</sup>	79.26%	84.97%	91.83%	96.91%	99.88%

x<sub>1</sub> = % methanol; x<sub>2</sub> = % acetonitrile; NS = not significant

In Figure 1 the contour plots for each parameter are presented. About the tailing factor and theoretical plates, any modification in the studied range would provide values within the specifications. In the case of resolution, it can be seen that the simultaneous increase of % methanol and % ACN would decrease the resolution. The capacity factor would be out of specification if methanol will be used in concentration above 65% or at smaller concentration if combined with high concentration of ACN. Thus, aiming to obtain a run time in the range of 5-10 minutes and appropriate chromatographic parameters, the mobile phase was defined as methanol:ACN:water, in the proportion of 60:5:35 (v/v/v). At each day of analysis, the pH of the purified water was measured and remained close to neutrality (USP 39, 2016).



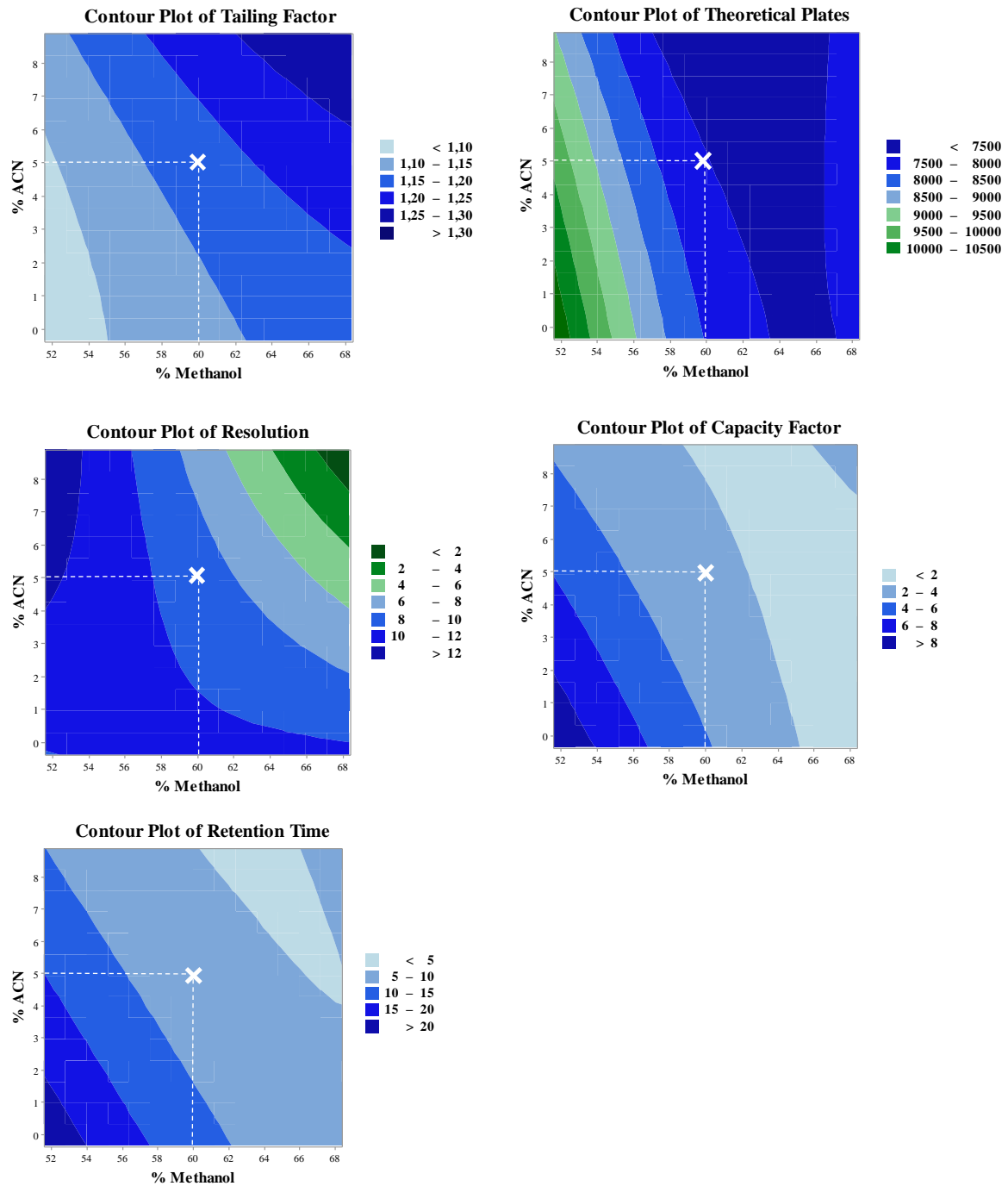


Figure 1: Contour plots of results for tailing factor (a), theoretical plates (b), resolution (c), capacity factor (d) and retention time (e) vs. % methanol and % ACN. Fixed factor: Purified water pH  $7.0 \pm 0.5$ .

## 3.2 Method validation

### 3.2.1 Specificity and forced degradation studies

The selectivity of the analytical method was evaluated submitting sample and standard to forced degradation conditions, which included: alkaline, acidic, neutral medium (at room or high temperature), oxidant media (hydrogen peroxide or metallic ions), humidity and

radiation (UV-A and UV-C). Stress testing should result in at least 5-20% degradation and the complete sample degradation should be avoided (ALSANTE et al., 2007; BRASIL, 2015), then preliminary tests were developed to achieve those values. The residual percentages obtained in the forced degradation test are shown in Table 4.

Table 4: Results of forced degradation test expressed as residual content of EMP standard and sample.

Stress condition	Exposition time	Residual content (%) <sup>a</sup>	
		EMP standard	EMP sample
2 M NaOH	7 h	85.72 ± 0.06	85.43 ± 0.05
1 M HCl	7 h	88.73 ± 0.05	87.98 ± 0.03
Neutral medium, room temperature	6 days	92.02 ± 0.03	90.16 ± 0.01
Neutral medium, 60 °C	6 days	86.65 ± 0.03	86.48 ± 0.01
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6 days	87.84 ± 0.02	88.74 ± 0.05
0.01 M CuSO <sub>4</sub>	5 h	89.99 ± 0.09	87.53 ± 0.07
UV-A (365 nm)	30 min <sup>b</sup>	79.58 ± 0.03	77.25 ± 0.04
UV-C (254 nm)	3 h	78.04 ± 0.01	76.29 ± 0.02
Solid state, 40 °C/75% RH	30 days	89.68 ± 0.27	90.17 ± 0.43

<sup>a</sup> n=2 for each condition; <sup>b</sup> irradiation time equivalent to 3460 Wh m<sup>-2</sup>

The results indicated that empagliflozin degraded in all the experimental stress conditions, but UVA and UVC radiation promoted the faster decrease in the drug content. In neutral media temperature showed just a subtle effect on EMP degradation, being the residual values near to 86%, similar to the results obtained in smaller temperature. This was an unexpected result, since increment in temperature is related to an increase on degradation rate. In addition, samples maintained at 30 days humidity and temperature (75% HR at 40°C) showed tablet content and standard 90.17% ± 0.43 and 89.68% ± 0.27, respectively. There were no additional peaks arising from degradation products for any of the conditions described above (chromatograms not shown), in the 190-400 nm range, except for UVA and UVC degradations. For both conditions were observed additional peaks, including a majority peak in 4.8 min (Figure 2). The purity of the EMP peak was checked in all degradation conditions by means of PDA detector, with values > 0.9999 being obtained under all

conditions, confirming that there was no co-elution and the method specificity. The similarity between the EMP residual values for sample and standard suggest that the excipients did not interfere in the degradation behavior of the EMP molecule, in most of the conditions employed.

### **3.2.2 Linearity and limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ)**

Three calibration curves for EMP were plotted showing correlation coefficient ( $r$ ) 0.9998 and linear equation  $y = 57674x - 6923.9$ . Analysis of variance indicated significant regression ( $F_{\text{calculated}} = 2029.01 > F_{\text{critical}} = 4.96$ ,  $\alpha = 0.05$ ) and no linear deviation from linearity ( $F_{\text{calculated}} = 1.88 < F_{\text{critical}} = 3.71$ ,  $\alpha = 0.05$ ), in the range of 5 to 150  $\mu\text{g/mL}$ . The calculated values indicated a LOD of 0.087  $\mu\text{g/mL}$  and a LOQ of 0.264  $\mu\text{g/mL}$ , which were experimentally tested by preparing and injecting at these concentrations. The results were satisfactory and indicated the method good sensitivity.

### **3.2.3 Precision**

The precision of the method was confirmed by the RSD values  $< 2.0\%$ , calculated from the intra-day assay values ( $99.04\% \pm 0.56$ , RSD = 1.39%, analyst A, day 1,  $n=6$ ) and from the intermediate precision assay values ( $98.63\% \pm 0.75$ , RSD = 1.85%, analyst B, day 2,  $n=6$ ). These results also indicated that the mean EMP content ( $98.84 \pm 0.45$ , RSD = 1.58%,  $n=12$ ) was within the usual compendial value to drug products.

### **3.2.4 Accuracy**

The accuracy of the method was checked by the recovery percentual of standard added to sample solution at three different concentrations levels. The results, including the mean of the recovery and the standard deviation are shown in Table 5. All the independent recovery values as well as the mean recovery of EMP (99.78%,  $n=9$ ) met the acceptable range (SHABIR, 2003).

Table 5: Results obtained to accuracy using the proposed HPLC method.

Level (%)	Concentration added ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery Concentration ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recovery (%)	Mean <sup>a</sup> (%)	RSD (%)
80	15.0	14.98	99.89	99.37 $\pm$ 0.32	0.56
		14.91	99.42		
		14.82	98.78		
100	25.0	24.69	98.77	99.50 $\pm$ 0.50	0.87
		25.11	100.46		
		24.81	99.27		
120	35.0	35.52	101.49	100.49 $\pm$ 0.70	1.22
		34.69	99.12		
		35.30	100.85		
<b>Mean<sup>b</sup> (%)</b>				99.78 $\pm$ 0.32	0.96

<sup>a</sup>n=3; <sup>b</sup>n=9

### 3.2.5 Robustness

The test was performed through modifications in the analytical conditions aiming to demonstrate the method is not affected by them. The results (Table 6) demonstrated that the chromatographic parameters were altered but without compromise the empagliflozin assay. The content of the EMP maintained RSD = 0.12 for all the chromatographic conditions.

Table 6: Results of the method robustness study

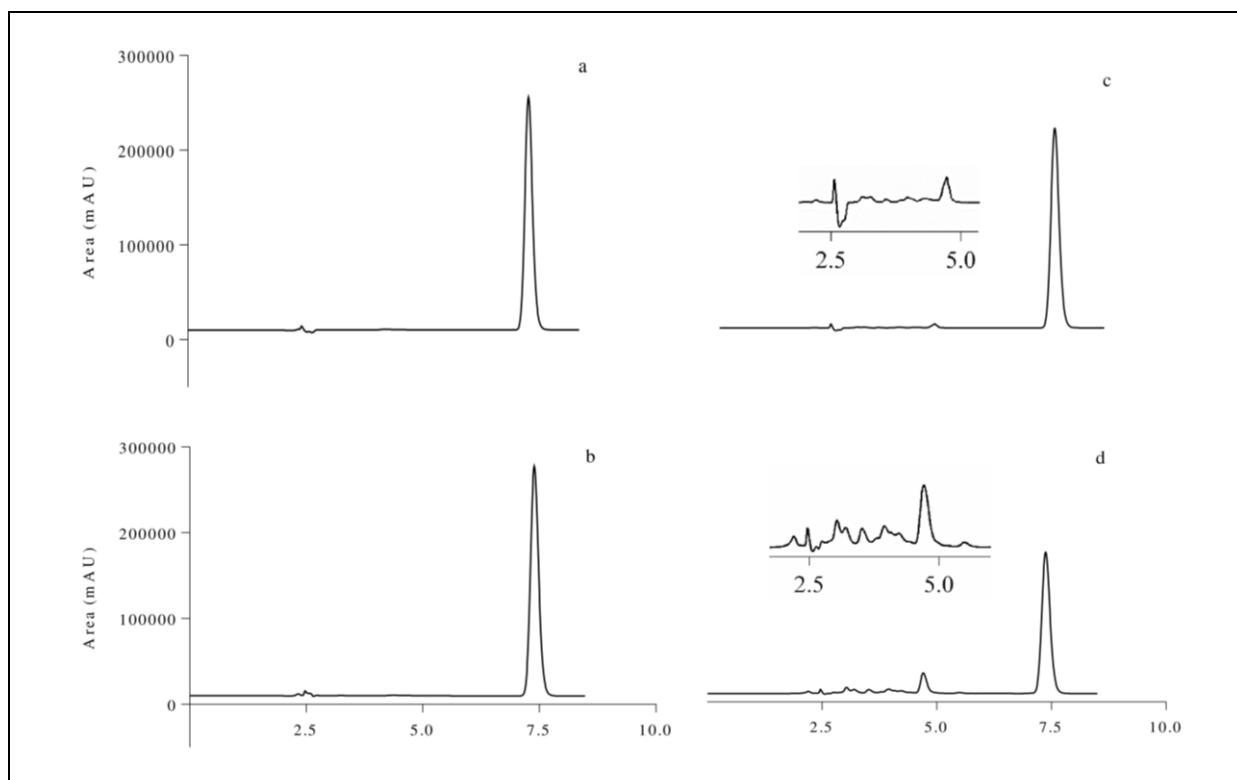
Variation	Retention Time	Theoretical plates	Tailing factor	Capacity factor	Assay %
Optimized conditions	7.65	7253.01	1.147	2.490	99.62 $\pm$ 0.12
Flow 0.8 mL/min	9.74	8474.90	1.154	2.491	99.52 $\pm$ 0.08
Flow 1.2 mL/min	6.59	6250.73	1.143	2.486	99.38 $\pm$ 0.05
Methanol content 65%	5.68	6548.34	1.191	2.150	99.65 $\pm$ 0.14
Methanol content 55%	11.84	8248.41	1.115	4.152	99.76 $\pm$ 0.10
Column Nanoseparation, using optimized conditions	7.44	8064.86	1.215	3.085	99.54 $\pm$ 0.18

### 3.3 Isolation and identification of degradation product by HRMS

In the forced degradation study several peaks of degradation products were observed when EMP solution was exposed to UV-A and UV-C light, and the main peak, detected at 4.8

minutes, was observed under the two radiation sources (Figure 2-c and 2-d). The overlapping of the spectra (Figure 2-e) of both degradation products provided a similarity index greater than 0.999, suggesting that the peaks correspond to the same compound, even though under UV-C radiation higher levels are generated due its higher energy. The quantity of the degradation product was calculated taking EMP peak as reference and they levels are 9.5% and 0.8% in the degraded samples (UV-C and UV-A radiation, respectively) (GOROG, 2003).

Therefore, the degradation product was isolated after degradation by UV-C light, by semipreparative-LC.



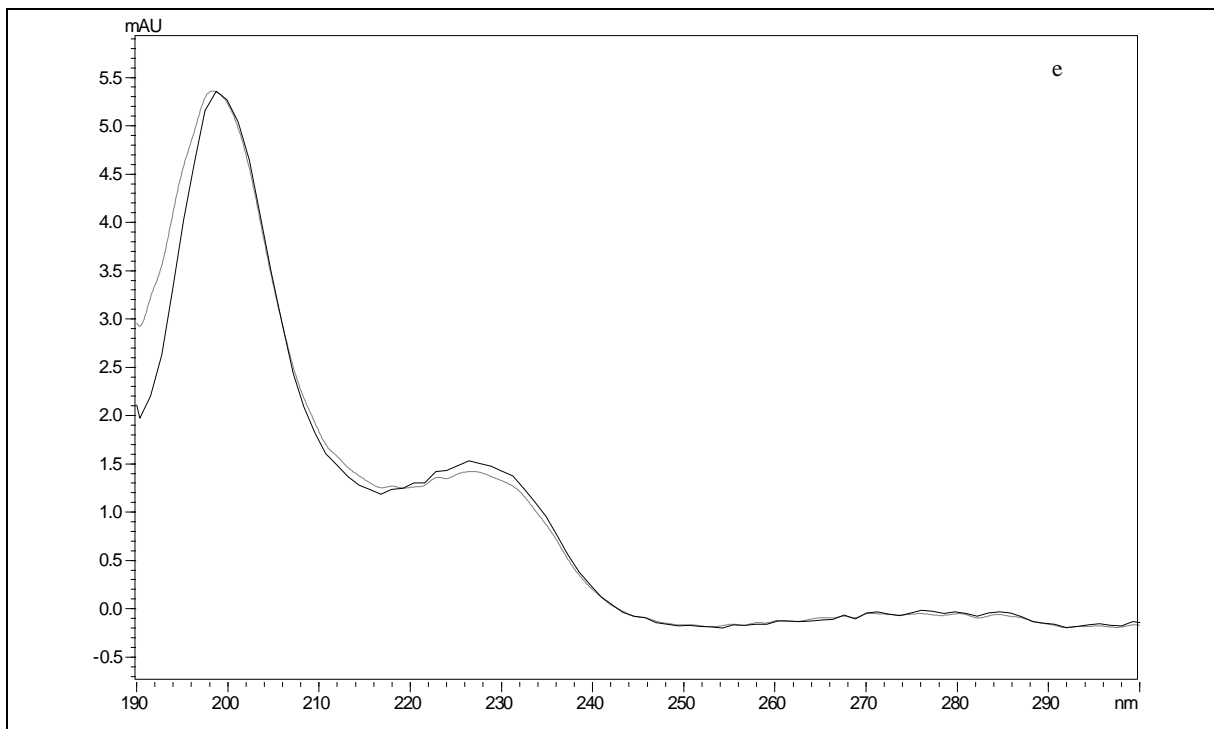


Figure 2: Chromatogram of standard (a); sample (b); sample under UV-A degradation (c); sample under UV-C degradation (d) and spectrum overlap of the major degradation peak (4.8 minutes) obtained under UV-A ( $DP_{UVA}$ ) and UV-C ( $DP_{UVC}$ ) radiation (e).

In order to isolate and characterize  $DP_{UVC}$ , the mobile phase was modified to MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v) to reduce the solvent interference in mass spectrometric analyzes.

The EMP standard was directly infused into the mass spectrometer in the full scan mode and showed the protonated form  $[M + H^+]$  as the molecular ion of  $m/z$  451.8837 (Figure 3). The ion  $m/z$  476.8858 refers to the EMP adduct with the sodium ion. In addition, the chlorine (Cl) atom in the molecule generates several emissions due to the <sup>35</sup>Cl and <sup>37</sup>Cl isotopes corresponding to the ions  $m/z$  453.8807 and  $m/z$  475.8862. The EMP MS/MS spectrum (not shown) also presented the fragmentation pattern of molecules that contains chlorine, being observed fragments  $[M+]$  and  $[M+2]$ . The spectrum also indicated a fragment  $m/z$  71.0501 that was predicted as well as the main fragments  $m/z$  289.8864 and  $m/z$  415.9326 (DRUGBANK). These data confirmed the identity of EMP standard.

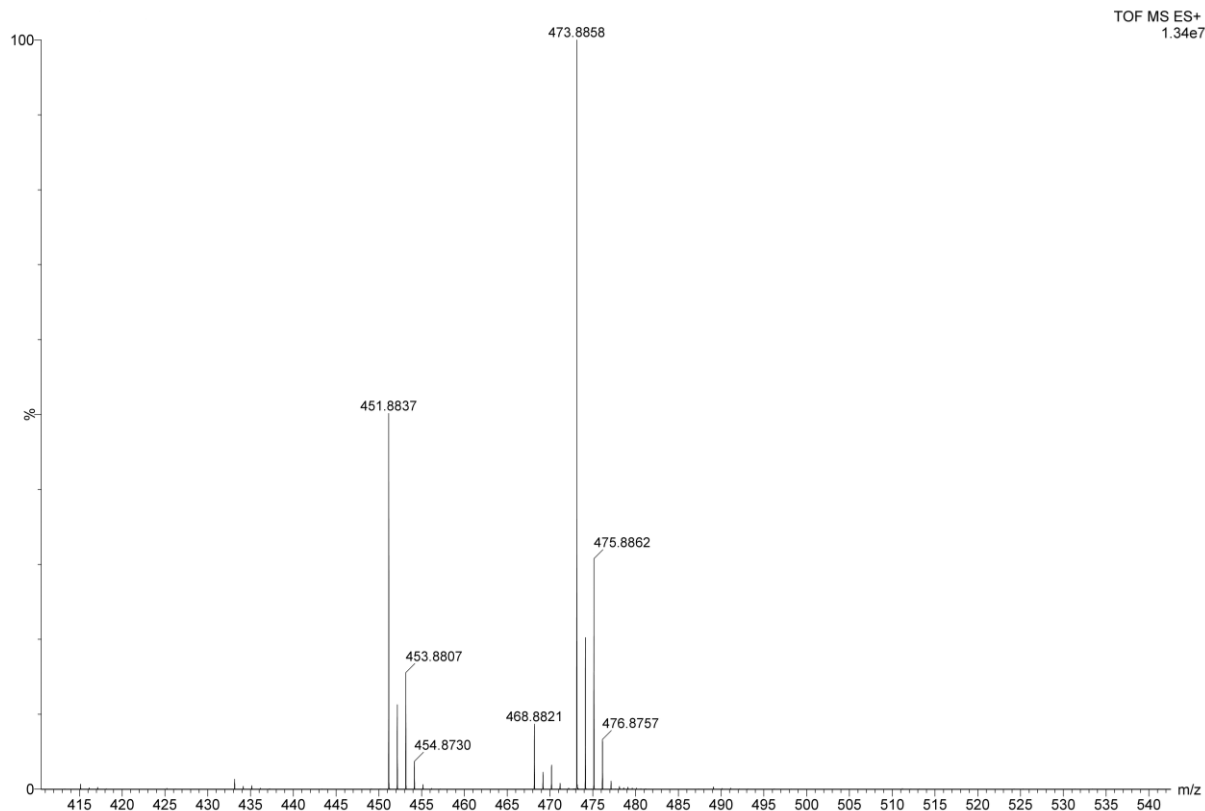


Figure 3: Full-scan mass spectrum obtained of EMP standard.

The  $DP_{UVC}$  isolated by semipreparative-LC was injected and a molecular ion with  $m/z$  439.8732 was observed, consistent to the loss of two water molecules from the EMP sodium-adduct ( $m/z$  473.8858). Fragmentation of  $m/z$  439.8732 ion produced a daughter ion  $m/z$  281.0232 (Figure 4). It is necessary to emphasize the difference between the terms accurate mass and exact mass. In Table 7 were observed the summarized data of HRMS identification of EMP and  $PD_{UVC}$ . Accurate mass is the experimental quantity that is measured and exact mass the calculated quantity. The values  $\leq 5$ ppm were acceptable for proposing a molecular formula (BALOGH, 2004) and suggesting a mechanism of photolysis degradation as shown in Figure 5.

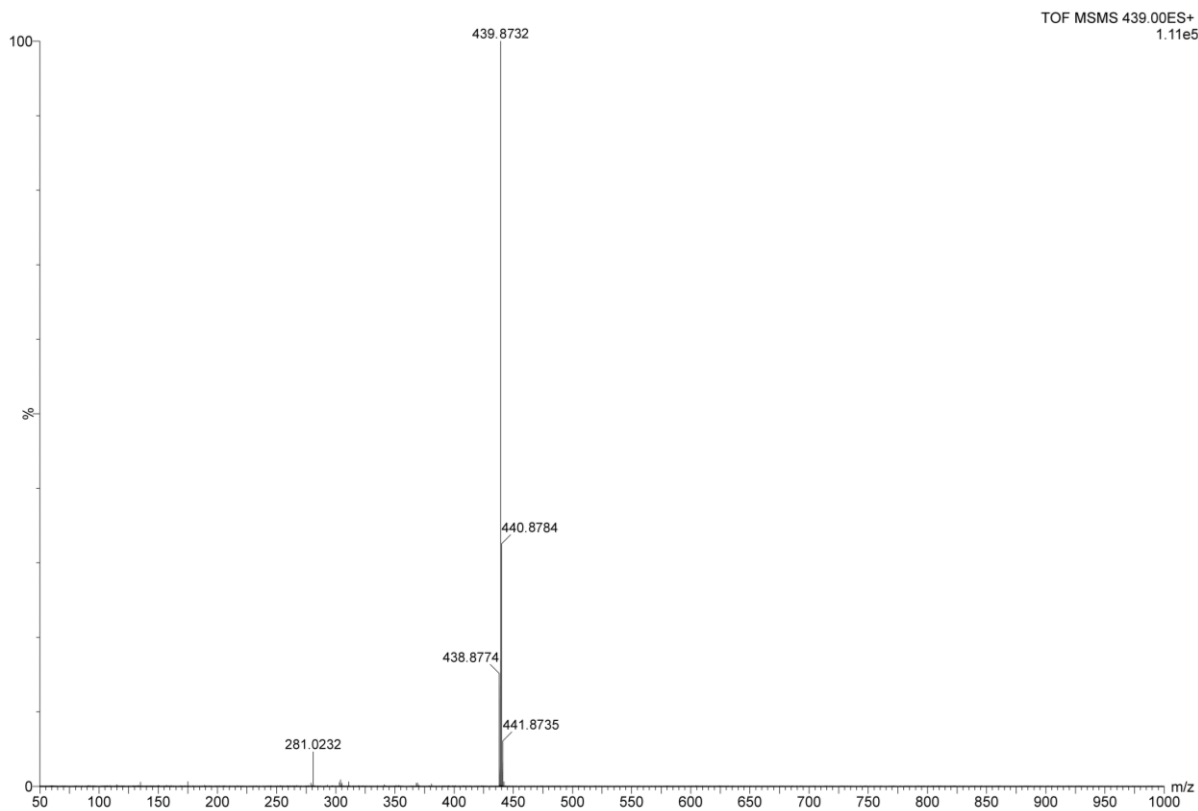


Figure 4: High resolution MS/MS spectrum of DP<sub>UVC</sub>.

Table 7: Data obtained from HRMS analysis.

<b>Compound</b>	<b>Molecular formula</b>	<b>HRMS calculate</b>	<b>HRMS experimental</b>	<b>Mass accuracy (ppm)</b>
EMP	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> ClO <sub>7</sub> Na*	473.8839	473.8858	4.01
DP <sub>UVC</sub>	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> ClO <sub>5</sub> Na*	439.8721	439.8732	2.50

\*Na adduct



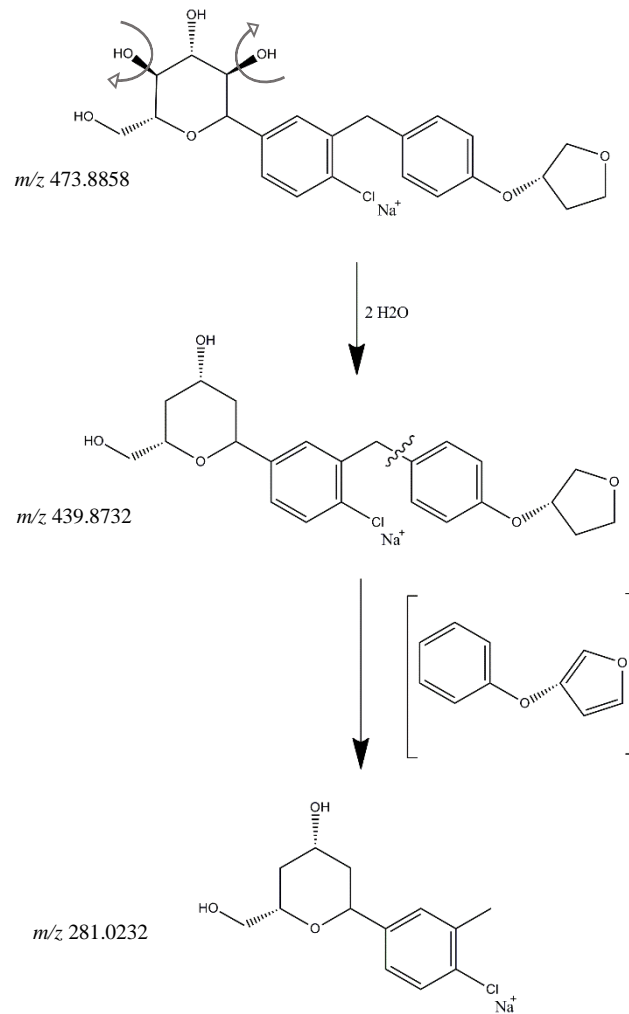


Figure 5: Proposed chemical mechanism to DP<sub>UVC</sub>.

## 4 Conclusions

A HPLC stability-indicative method to assay empagliflozin tablets, optimized by a factorial design, was developed. The method demonstrated suitable specificity, linearity, precision, accuracy and robustness. Forced degradation studies were performed and the main degradation product observed after exposure to UV-C and UV-A was isolated. Based on Q-TOF fragmentation data, the product was identified as a dehydrate form of empagliflozin.

## Acknowledgements

The authors thank to Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Financial Code 001.

## References

- ABDEL-GHANY, M.F., ABDEL-AZIZ, O., AYAD, M.F., TADROS, M.M. Pharmaceutical analysis of linagliptin and empagliflozin using LC-MS/MS; *Der Pharma Chemical*, v. 8, n. 17, p. 186-189, 2016.
- ABDEL-GHANY, M.F.; AYAD, M.F.; TADROS, M.M. Liquid chromatographic and spectrofluorimetric assays of empagliflozin: Applied to degradation kinetic study and content uniformity testing. *Luminescence*, v. 33, p. 919–932, 2018.
- ALSANTE, K.M., ANDO, A., BROWN, R., ENSING, J., HATAJIK, T.D., KONG, W., TSUDA, Y. The role of degradant profiling in active pharmaceutical ingredients and drug products, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p. 29-37, 2007.
- 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. Quantitative analysis of drugs with highly different concentrations of pharmaceutical components using spectral subtraction techniques. *Journal of Applied Spectroscopy*, v. 84, n. 5, 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.
- BALOGH, M.P. Debating resolution and mass accuracy in mass spectrometry, *Spectroscopy*, v. 19, p. 34–40, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE no 53, de 04 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e dá outras providências. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE no 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. 2017.
- DRUGBANK. Disponível em <https://www.drugbank.ca/drugs/DB09038>. Acesso em 13 de outubro de 2018.
- EMPAGLIFLOZINA. BULA Alemanha. Boehringer Ingelheim, 2015.
- GALLO, L.A.; WRIGHT, E.M.; VALLON, V. Probing SGLT2 as a therapeutic target for diabetes: Basic physiology and consequences *Diabetes & Vascular Disease Research*, 2015, v. 12, n. 2, p. 78–89, 2015.
- GERICH JE. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycaemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabetes Medical*, v. 27, p. 136–142, 2010.
- GOPAL, N.; 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, 2017.
- GOROG, S. Critical review of reports on impurity and degradation product profiling in the last decade. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 101, p. 2-16, 2018.
- GREMLER, R. et al. Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterisation and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 14, n. 1, p. 83–90, 2012.
- FRIEDRICH, C. et al. A Randomized, Open-Label, Crossover Study to Evaluate the Pharmacokinetics of Empagliflozin and Linagliptin After Coadministration in Healthy Male Volunteers. *Clinical Therapeutics*, v. 35, n. 1, p. 33–42, 2013.

- HEISE, T. et al. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Multiple Rising Doses of Empagliflozin in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Therapy*, v. 4, n. 2, p. 331–345, 2013.
- HIBBERT, B.D. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B*, v. 910, p. 2–13, 2012.
- ICH. HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q2 (R1): Guideline on Validation of Analytical Procedure – Methodology, 2005.
- ICH. HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q3A (R2): Impurities In New Drug Substances – Methodology, 2006.
- LEITE, F. Impurezas de Degradação. *Scientia Chromatographica*, v. 1, n. 2, 2009.
- NARAYANAM, M. et. al. Critical practical aspects in the application of liquid chromatography–mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013.
- SHYAMALA, NIRMALA, K., MOUNIKA, J., NANDINI, B. Validated stability-indicating RP-HPLC method for determination of empagliflozin; *Der Pharmacia Lettre*; v. 8, n. 2, p. 457-464, 2016.
- PADMAJA N. AND VEERABHADRAM G., method development and validation of RP-HPLC method for the estimation of empagliflozin in API, *International Journal of Pharmaceutical Science Res.*, v. 7, p. 724-727, 2016.
- ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. editors. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6th ed. London: Pharmaceutical Press; 2009.
- SHABIR, G.A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US food and drug administration, the US pharmacopeia and the international conference. *Journal of Chromatography A*, v. 987, n 2, p. 57-66, 2003.
- SWARUPA, G. P.; LAKSHMANA RAO K.; PRASAD KRS.; SURESH BABU K. 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, 2016.
- USP 39. *The United States Pharmacopeia*. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2016.
- 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.
- WILDING, J. P. H. et al. A Study of Dapagliflozin in Patients With Type 2 Diabetes Receiving High Doses of Insulin Plus Insulin Sensitizers: Applicability of a novel insulin-independent treatment. *Diabetes Care*, v. 32, n. 9, p. 1656–1662, 2009.
- ZHOU, H. et al. Related substances in empagliflozin determined by LC-MS/MS. *International Journal of Pharmaceutical Research*, v. 4, p. 753-756, 2016.
- ZINMAN, B. et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 22, p. 2117–2128, 2015



## 6 DISCUSSÃO GERAL

No Capítulo 1 foi descrito o desenvolvimento de formulações extemporâneas líquidas orais a partir de comprimidos contendo empagliflozina e seu estudo de estabilidade.

Uma formulação estável deve possuir características organolépticas (aspecto, cor, odor e sabor) que proporcionem a aceitação pelo paciente, além de apresentar estabilidade química, física e microbiológica. Suspensões devem, ainda, possuir boa fluidez e suas partículas devem possuir tamanho reduzido, para diminuir a velocidade de sedimentação a fim de proporcionar a administração de uma dose uniforme e terapeuticamente ativa do medicamento (SINKO, 2008; ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2000). Ambas as formulações desenvolvidas apresentaram características adequadas durante 25 dias a 25° C. O teor de empagliflozina foi maior que 95% em 25 dias e 45 dias para F1 e F2, respectivamente. O pH de ambas as formulações foi em torno de 6,5, que é o pH ótimo da estabilidade da EMP, como observado nos estudos preliminares, e permaneceu constante durante o estudo ( $p > 0,05$ ).

O volume de sedimentação de F1 foi menor do que o F2, que pode estar relacionado aos materiais poliméricos usados em cada formulação. O HPMC é um polímero não iônico capaz de estabilizar partículas dispersas resultantes da interação estérica entre as partículas de fármaco revestidas com o polímero adsorvido em sua superfície, causando repulsão das partículas. Essa energia de repulsão faz com que as partículas permaneçam separadas ou defloculadas, ou seja, as partículas se comportam de forma independente, sedimentam lentamente formando um sedimento compacto de difícil redispersão (AULTON, 2016). O volume de sedimento da F1 foi de 0,03, apresentando características de um sistema defloculado ( $< 0,1$ ). Por outro lado, o CMC é um polímero iônico que se deposita na superfície das partículas, proporcionando um afinamento da camada difusa da partícula e a agregação das partículas através das forças de Van der Waals, resultando em um aumento no comportamento da floculação. O volume de sedimento do F2 foi de 0,31, apresentando características de um sistema floculado (entre 0,1 e 0,6), onde as partículas estão dispostas em agregados livres, com rápida sedimentação e fácil redispersão (AULTON, 2016). Embora tenha diferença entre as formulações, todas as características físicas não influenciaram no teor das suspensões F1 e F2 que se mantiveram entre 95% e 100% durante os 25 dias.

O crescimento de micro-organismos nos produtos farmacêuticos pode alterar a estabilidade das formulações como a degradação do insumo farmacêutico ativo (IFA), mudanças organolépticas e danos ao consumidor (ORTH, 2007). Por isso é importante optar pela escolha de conservantes que limitem o crescimento de micro-organismos mantendo a

estabilidade das formulações (PEREIRA, 2011). Os parabenos possuem características que incluem um amplo espectro de atividade antimicrobiana, estabilidade química em uma ampla faixa de pH e baixo custo (PEREIRA, 2011; TAGLIARI, 2009). A combinação deles pode demonstrar efeitos sinérgicos na conservação de formulações farmacêuticas. Os conservantes utilizados no preparo das formulações extemporâneas foram 0,1% de metilparabeno e 0,02% de propilparabeno e estão de acordo com o *Handbook of excipients* em que a quantidade permitida para formulações orais é de 0,015-0,2% de metilparabeno e 0,01-0,02% de propilparabeno (ROWE; SHESKEY; QUINN, 2009). A adição destes conservantes às formulações foi fundamental para a inibição do crescimento dos micro-organismos que ficaram dentro dos limites especificados durante 25 dias.

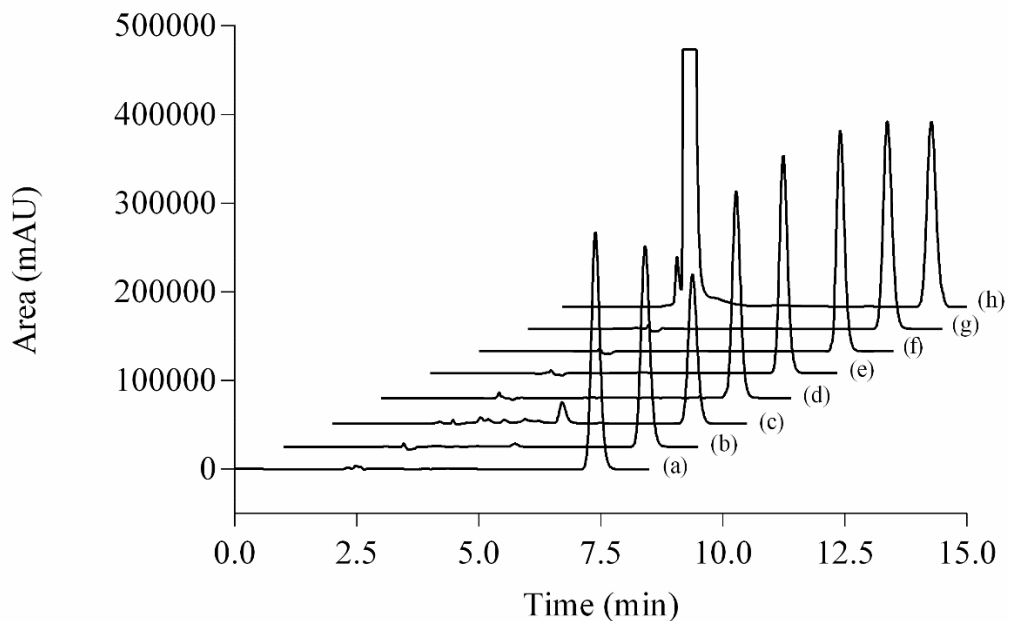
Pode-se notar que as formulações mantiveram o teor dentro do adequado (95%) durante 25 dias a 25 °C. Os limites microbianos também estiveram dentro dos especificados para fungos e bactérias. As normas da Farmacopeia Norte-Americana sobre estabilidade de formulações extemporâneas líquidas de uso oral preparadas a partir de formas farmacêuticas sólidas preconizam validade de 14 dias sob refrigeração. Portanto, tanto F1 quanto F2 estão de acordo com os compêndios oficiais sobre estabilidade demonstrando serem adequadas ao desenvolvimento e uso hospitalar.

O Capítulo 2 apresentou o desenvolvimento e validação de método analítico por HPLC-UV para comprimidos de empagliflozina, empregando planejamento fatorial completo  $2^3$  para otimização das condições analíticas, e identificação do produto de degradação majoritário após degradação forçada por radiação UV-C. Observou-se que, todos os parâmetros avaliados (resolução, pratos teóricos, fator capacidade, assimetria e tempo de retenção) foram afetados significativamente ( $p < 0.05$ ) quando as proporções de metanol e acetonitrila foram modificadas e que as modificações no pH da água não apresentaram diferença estatística ( $p > 0.05$ ) em nenhum parâmetro analisado. Desta forma pode-se afirmar que o pH da água não interfere na quantificação da EMP, não requerendo controle durante a análise.

Os resultados do estudo de degradação forçada corroboraram os obtidos em estudos anteriores que demonstraram sua maior suscetibilidade nos meios alcalino, ácido, oxidativo e fotolítico (GEETHA; SWARUPA, 2016; SYAMALA 2016; GOPAL & SRIDHAR, 2017). O teste de degradação forçada não evidenciou picos adicionais referentes a produtos de degradação em nenhum comprimento de onda na faixa de 190-400 nm, exceto pela fotodegradação em radiação UV-A e UV-C (Figura 2). Testes realizados submetendo as amostras por 1, 3 e 5 h na radiação UVC e 5, 15, 30 e 45 min na radiação UVA demonstraram

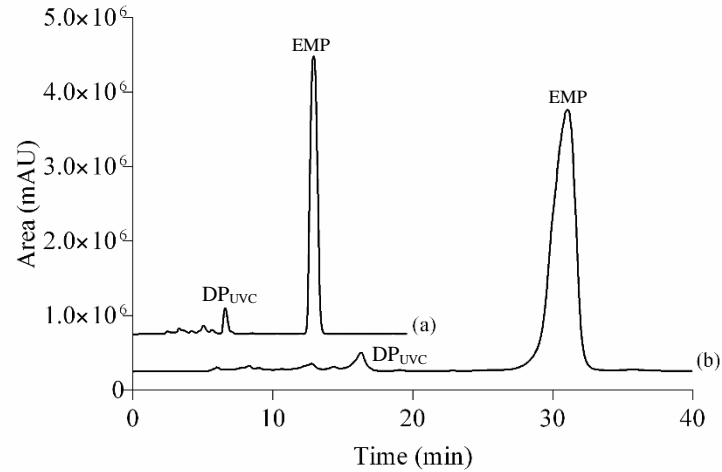
a formação do produto de degradação no tempo de retenção próximo a 4,8 minutos para ambas as condições testadas, desde os primeiros tempos de exposição da amostra, mantendo-se crescente nos tempos seguintes. Isso indica que não houve a formação de produtos de degradação secundários, indicando a estabilidade do produto de degradação formado, cuja concentração aumentava proporcionalmente ao tempo de exposição à radiação.

Figura 2: Cromatogramas da amostra íntegra (a) e após condições de degradação: UVA (b), UVC (c), NaOH 2 M (d), HCl 1 M (e), H<sub>2</sub>O (f), CuSO<sub>4</sub> 0,01 M (g) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (h).



A sobreposição dos espectros do DP<sub>UVA</sub> e DP<sub>UVC</sub> demonstrou um índice de similaridade de 0,999 indicando que eles são equivalentes. Através do balanço de massas pode-se observar que a soma de todos os picos equivale a, aproximadamente, 99% indicando a sensibilidade do método em detectar quase que a totalidade dos produtos formados. O DP<sub>UVC</sub> foi isolado devido a maior concentração (9,5% da massa total detectada) quando comparado ao PD<sub>UVA</sub> (0,8% da massa total). Para o isolamento, a fase móvel foi modificada para MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v) com o objetivo de reduzir a interferência do solvente em análises por espectrometria de massas. A coluna analítica foi substituída pela coluna semi-preparativa e o pico do DP<sub>UVC</sub> foi coletado. Pode-se observar que o tempo de retenção da EMP e do DP<sub>UVC</sub> foram alterados (Figura 3) sem prejuízo dos parâmetros cromatográficos.

Figura 3: Cromatograma da amostra degradada utilizando fase móvel MeOH:H<sub>2</sub>O (60:40, v/v) em coluna analítica (a) e em coluna semi-preparativa (b).



Após o isolamento o DP<sub>UVC</sub> foi infundido diretamente no espectrômetro de massas no modo full scan e MS/MS. Através dos espectros de massas de alta resolução pôde-se propor a estrutura do PD<sub>UVC</sub> e uma possível rota de fragmentação foi sugerida a partir do íon molecular.





## 7 CONCLUSÕES

- As formulações extemporâneas desenvolvidas neste trabalho apresentaram características físico-químicas e microbiológicas satisfatórias;
- As formulações contendo empagliflozina não apresentaram diferença estatística para as características físico-químicas (tamanho de partícula, volume de sedimentação, pH) durante 25 dias armazenadas a 25 °C;
- O conjunto de resultados ao longo dos 60 dias sugeriu melhor estabilidade físico-química de F2, no entanto, os dados microbiológicos limitaram o uso de ambas formulações por 25 dias.
- As formulações demonstraram estar dentro dos limites especificados durante 25 dias de armazenamento corroborando com as recomendações da Farmacopeia Norte-Americana para formulações preparadas a partir de comprimidos;
- O método desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência, cuja fase móvel foi otimizada por delineamento fatorial completo demonstrou ser linear, específico, preciso, exato e robusto;
- Os estudos de degradação forçada demonstraram a instabilidade do fármaco frente a todas as condições de degradação, sendo mais intensa após exposição às radiações UV-A e UV-C;
- As análises realizadas por espectrometria de massas sugerem que o produto de degradação majoritário formado sob exposição à radiação corresponde a um derivado desidratado da empagliflozina. Uma estrutura e uma rota de degradação do produto de degradação formado foi sugerida;



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-GHANY, M. F. et al. Pharmaceutical Analysis of Linagliptin and Empagliflozin using LC-MS/MS. *Pharma Chemica*, v. 8, n. 17, p. 186–189, 2016.

ABDEL-GHANY, M. F.; AYAD, M. F.; TADROS, M. M. Liquid chromatographic and spectrofluorimetric assays of empagliflozin: Applied to degradation kinetic study and content uniformity testing. *Luminescence*, n. 33, p. 919–932, 2018.

AHMAD, I., AHMED, S., ANWAR, Z., et al. Photostability and Photostabilization of Drugs and Drug Products. *International Journal of Photoenergy*, p. 1–19, 2016. doi:10.1155/2016/8135608

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, v. 38, n. Supplement 1, p. S8–S16, 2015.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G.; ALLEN Jr., L. V. Formas farmacêuticas e sistema de liberação de fármacos. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2000.

AULTON, M. E. Delineamento de formas farmacêuticas, 4<sup>a</sup> ed., Elsevier; Rio de Janeiro, 2016.

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. Quantitative analysis of drugs with highly different concentrations of pharmaceutical components using spectral subtraction techniques. *Journal of Applied Spectroscopy*, v. 84, n. 5, 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.

BAENA-DIEZ, J.M. et al., Risk of Cause-Specific Death in Individuals with Diabetes: A Competing Risks Analysis *Diabetes Care*, v. 39, p. 1987–1995, 2016.

BLESSY, M. et al. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs - A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE nº 1, de 29 de julho, de 2005. Aprova o Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade. 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE no 67, de 8 de outubro de 2007. Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficiais para Uso Humano em farmácias. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE no 53, de 04 de dezembro de 2015. Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e dá outras providências. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução - RE no 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. 2017.

DIAS, F. L. Desenvolvimento e validação de método indicador de estabilidade de formulações farmacêuticas de uso tópico contendo peróxido de benzofla. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 2014.

DRUGBANK. Disponível em <https://www.drugbank.ca/drugs/DB09038>. Acesso em 13 de outubro de 2018.

EMPAGLIFLOZINA. BULA Alemanha. Boehringer Ingelheim, 2015.

FRIEDRICH, C. et al. A Randomized, Open-Label, Crossover Study to Evaluate the Pharmacokinetics of Empagliflozin and Linagliptin After Coadministration in Healthy Male Volunteers. *Clinical Therapeutics*, v. 35, n. 1, p. A33–A42, 2013.

GERICH, J. E. Role of the kidney in normal glucose homeostasis and in the hyperglycemia of diabetes mellitus: therapeutic implications. *Diabetic Medicine*, v. 27, p. 136–142, 2010.

GLASS, B. D.; HAYWOOD, A. Stability considerations in liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 9, n. 3, p. 398–426, 2006.

GOPAL, M. N.; SRIDHAR, C. A validated stability indicating a 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.

GREMLER, R. et al. Empagliflozin, a novel selective sodium glucose cotransporter-2 (SGLT-2) inhibitor: characterization and comparison with other SGLT-2 inhibitors. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 14, n. 1, p. 83–90, 2012.

HAYWOOD, A.; GLASS, B. D. Liquid dosage forms extemporaneously prepared from commercially available products – considering new evidence on stability. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*, v. 16, n. 3, p. 441 - 455, 2013.

HEISE, T. et al. Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics of Multiple Rising Doses of Empagliflozin in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Therapy*, v. 4, n. 2, p. 331–345, 2013.

HENRY, B.; FOTI, C.; ALSANTE, K. Can light absorption and photostability data be used to assess the photosafety risks in patients for a new drug molecule? *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 96 p. 57–62, 2009.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q1B: Photostability testing of new drug substances and products, 1996.

ICH – International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products, 2003.

ICH. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Q3a(R2): Impurities in New Drug Substances - Methodology, 2006.

IDF. International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 8<sup>th</sup> ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation; 2018.

KOHLER, S. et al. Safety and Tolerability of Empagliflozin in Patients with Type 2 Diabetes. *Clinical Therapeutics*, v. 38, n. 6, p. 1299–1313, 2016.

LEITE, F. Impurezas de Degradação. *Scientia Chromatographica*, v. 1, n. 2, 2009.

MACHA, S. et al. Effect of Empagliflozin on the Steady-State Pharmacokinetics of Ethinylestradiol and Levonorgestrel in Healthy Female Volunteers. *Clinical Drug Investigation*, v. 33, n. 5, p. 351–357, 2013.

MACHA, S. et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of empagliflozin, a sodium glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor, in subjects with renal impairment. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 16, n. 3, p. 215–222, 2014.

MAGNUSON, B. L. et al. Enteral Nutrition and Drug Administration, Interactions, and Complications. *Nutrition in Clinical Practice*, v. 20, n. 6, p. 618–624, 6 dez. 2005.

MARINHO, R. N. A.; CABRAL, C. H. K. Estudo de adaptações de formulações farmacêuticas em um Hospital Universitário Pediátrico. *Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde*, v. 5, n. 3, p. 12–17, 2014.

MILECH, A.; OLIVEIRA, J. E. P. DE; VENCIO, S. *Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes*. São Paulo: A.C. Farmacêutica, 2016.

NARAYANAM, M. et al. Critical practical aspects in the application of liquid chromatography–mass spectrometric studies for the characterization of impurities and degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.027>

NISSEN, L. M.; HAYWOOD, A.; STEADMAN, K. J. Solid medication dosage form modification at the bedside and in the pharmacy of Queensland Hospitals. *Journal of Pharmacy Practice and Research*, v. 39, n. 2, p. 129–134, 2009.

ORTH, DS. Principles of Preservation. Denyer SP Bainrd RM. In: Guide to microbiological Control in Pharmaceutics and Medical Devices. Second Edition. Boca Raton, London, New York: CRC Press, p. 309-321, 2007.

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*, 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.

PEREIRA, T. A. Avaliação da eficácia de um sistema conservante em formulações adicionadas de biomoléculas farmacêuticas e estudos de adaptação microbiana. 2011. 89 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

ROWE, R.C.; SHESKEY, P.J.; QUINN, M.E. editors. Handbook of pharmaceutical excipients. 6th ed. London: Pharmaceutical Press; 2009.

SHYAMALA et al. Validated stability-indicating RP-HPLC method for determination of Empagliflozin. *Der Pharmacia Lettre*, v. 8, n. 2, 2016.

SINKO PJ. Martin: Físico-farmácia e Ciências Farmacêuticas. 5.ed. Porto Alegre: Artmed: 2008.

SOUZA, G. B. Manipulação Magistral de Medicamentos em Pediatria. Pharmabooks, 2003.

STORPIRTIS, S. et al. Ciências Farmacêuticas: Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 171-181, 2011.

SWARUPA, G. et al. Development and validation of stability indicating a 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, p. 126–135, 2016.

TAGLIARI, M. P. et al. Evaluation of physicochemical characteristics of suspensions containing hydrochlorothiazide developed for pediatric use. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 28, n. 5, p. 734–740, 2009.

TØNNESEN, H. H. Introduction: Photostability testing of drugs and drug formulations – Why and how? In: TONNESEN, H. H. Photostability of drugs and drug formulations. 2nd ed. London: CRC Press LCC, 2004.

TØNNESEN, H. H. Formulation and stability testing of photolabile drugs. [s.l.] *International Journal of Pharmaceutics*, v. 225, p. 1-14, 2008.

VENTURA, D. M. Desenvolvimento farmacotécnico de formulações de suspensões de hidroclorotiazida obtidas por transformação de formas farmacêuticas. [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2011.

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.

WILDING, J. P. H. et al. A Study of Dapagliflozin in Patients With Type 2 Diabetes Receiving High Doses of Insulin Plus Insulin Sensitizers: Applicability of a novel insulin-independent treatment. *Diabetes Care*, v. 32, n. 9, p. 1656–1662, 2009.

ZHOU, H. et al. Related substances in empagliflozin determined by LC-MS/MS. *International Journal of Pharmaceutical Research*, n. 4, p. 753–756, 2016.

ZINMAN, B. et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 22, p. 2117–2128, 2015.