

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

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO  
DE DAPAGLIFLOZINA EM COMPRIMIDOS E AVALIAÇÃO DE SEU PERFIL DE  
IMPUREZAS**

LÍVIA MARONESI BUENO

Porto Alegre, 2021



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

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO  
DE DAPAGLIFLOZINA EM COMPRIMIDOS E AVALIAÇÃO DE SEU PERFIL DE  
IMPUREZAS**

Tese apresentada por **Lívia Maronesi Bueno** para  
obtenção do GRAU DE DOUTORA em Ciências  
Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elfrides Eva Scherman Schapoval

Porto Alegre, 2021

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 15/03/2021, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Andreas Sebastian Loureiro Mendez  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Flávia Nathiely Silveira Fachel  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Andrea Inês Horn Adams  
Universidade Federal de Santa Maria

### CIP - Catalogação na Publicação

Bueno, Livia Maronesi  
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA  
DETERMINAÇÃO DE DAPAGLIFLOZINA EM COMPRIMIDOS E  
AVALIAÇÃO DE SEU PERFIL DE IMPUREZAS / Livia Maronesi  
Bueno. -- 2021.  
123 f.  
Orientadora: Elfrides Eva Scherman Schapoval.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2021.

1. Dapagliflozina. 2. cromatografia. 3. impurezas.  
I. Eva Scherman Schapoval, Elfrides, orient. II.  
Título.

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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle de Qualidade Farmacêutico do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul na cidade de Porto Alegre. A autora recebeu bolsa CAPES.



## RESUMO

A dapagliflozina (Forxiga®) é o primeiro fármaco de uma nova classe de agentes utilizados no tratamento de pacientes com *Diabetes Mellitus* tipo 2. Pela inibição da proteína co-transportadora de glicose SGLT2 nos rins, a dapagliflozina reduz a reabsorção de glicose, levando a um aumento em sua excreção urinária e consequente redução em seus níveis séricos. Os estudos de desenvolvimento de métodos analíticos para avaliação da dapagliflozina, bem como de suas substâncias relacionadas, ainda são escassos frente a sua importância para o controle de qualidade de medicamentos. Assim, o presente trabalho teve como objetivos o desenvolvimento e a validação de metodologia analítica para a quantificação da dapagliflozina em comprimidos e determinação de seu perfil de impurezas. Foram desenvolvidos métodos para determinação da dapagliflozina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por eletroforese capilar (EC). Ambos foram validados de acordo com os parâmetros de especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez, e apresentaram resultados satisfatórios conforme preconizado nos guias oficiais. O método por CLAE apresentou vantagens como baixos limites de detecção e quantificação da substância ativa e rapidez na análise, enquanto o método por EC se destacou pelo seu baixo custo e reduzida geração de resíduos. Ademais, foi desenvolvido e validado, seguindo os mesmos parâmetros citados anteriormente, um método por cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE) para a determinação simultânea da dapagliflozina na presença de três impurezas relacionadas. O método apresentou resultados adequados para a separação, detecção e quantificação dessas substâncias em um reduzido tempo de análise, e atendeu a todos os requisitos da validação analítica. O potencial tóxico das impurezas e do fármaco foi avaliado e foram obtidos resultados de citotoxicidade que indicaram diferentes graus de citotoxicidade entre as impurezas após 24 e 96 horas de exposição, em diferentes concentrações. Dano ao DNA não foi observado em nenhuma das concentrações testadas.

**Palavras-chave:** dapagliflozina; CLAE; CLUE; EC; impurezas; toxicidade.





## ABSTRACT

Dapagliflozin (Forxiga®) is the first in a novel class of agents used in the treatment of patients with type 2 *Diabetes Mellitus*. By inhibiting the glucose co-transporter protein SGLT2, the dapagliflozin reduces renal glucose reabsorption by the kidney, leading to an increase in its urinary excretion and consequent reduction in blood glucose levels. Development studies of analytical methods for analysis of dapagliflozin and its related substances are still limited considering its importance to the quality control of drug products. Therefore, this study aims to develop and validate analytical methods for the quantification of dapagliflozin in tablets and determination of its impurities profile. Methods for the determination of dapagliflozin by high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (EC) were developed. Both were validated according to the parameters of specificity, linearity, limits of detection and quantification, precision, accuracy and robustness, and presented satisfactory results as recommended in the official guides. The HPLC method showed advantages as low limits of detection and quantification of the active substance and fast analysis time. On the other hand, the CE method stands out by its low cost and production of organic waste. In addition, an ultra-performance liquid chromatography (UPLC) method for the simultaneous determination of dapagliflozin in the presence of three related impurities was developed and validated, following the same parameters previously mentioned. The method presented adequate results for the separation, detection and quantification of these substances in a short time of analysis, and met all the requirements of the analytical validation. The toxicity of impurities and the drug was evaluated in 3T3 cells, by MTT, Red Neutral (RN) tests, evaluation of mitochondrial membrane potential, measurement of intracellular reactive species and comet assay. The cytotoxicity results obtained indicated different levels of cytotoxicity of the impurities after 24 and 96 hours of exposure, in different concentrations. DNA damage was not observed in any of the concentrations tested.

**Keywords:** dapagliflozin; HPLC; UPLC; CE; impurities; toxicity.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. OBJETIVOS .....	18
2.1 OBJETIVO GERAL .....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1 Diabetes Mellitus.....	23
3.2 Fármacos hipoglicemiantes .....	24
3.3 Dapagliflozina .....	25
3.3.1 Processo de síntese .....	27
3.3.2 Análise quantitativa e estudos de estabilidade .....	28
3.4 Controle de impurezas em produtos farmacêuticos .....	29
3.4.1 Resíduos de solventes.....	31
3.4.2 Impurezas inorgânicas.....	31
3.4.3 Impurezas orgânicas.....	31
3.5 Qualificação de impurezas.....	34
3.5.1 Ensaio de citotoxicidade e genotoxicidade .....	35
3.5.2 Ensaio de genotoxicidade .....	38
3.6 Metodologia analítica para análise de fármacos e impurezas relacionadas 38	
3.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	39
3.6.2 Cromatografia líquida de ultraeficiência .....	40
3.6.3 Eletroforese Capilar .....	41
3.7 Validação da metodologia analítica .....	42
4 CAPÍTULO I. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE DAPAGLIFLOZINA EM COMPRIMIDOS .....	47

4.1	Introdução .....	47
4.2	Materiais .....	47
4.3	Desenvolvimento do método por CLAE .....	48
4.3.2	Validação do método analítico por CLAE .....	50
4.3.3	Resultados e discussão .....	54
4.3.4	Conclusão .....	60
4.4	Desenvolvimento de método por EC .....	61
4.4.1	Ensaio preliminares .....	63
4.4.3	Resultados e Discussão .....	67
4.4.4	Conclusão .....	74
4.5	Paralelo comparativo entre os métodos por CLAE e EC para a determinação da dapagliflozina em comprimidos .....	74
4.6	Conclusão .....	76
5	CAPÍTULO II. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DE DAPAGLIFLOZINA E AVALIAÇÃO DO SEU PERFIL TOXICOLÓGICO .....	80
5.1	INTRODUÇÃO .....	80
5.2	ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO .....	83
	ABSTRACT .....	83
	1. Introduction .....	84
	2. Material and methods .....	86
	2.1. Chemicals .....	86
	2.2. Apparatus description .....	86
	2.3. Stock solution preparation .....	86
	2.4. Method validation .....	87
	2.5 Cell culture .....	89
	2.6 Citotoxicity assay .....	89
	4. Results and Discussion .....	92

4.2. Analytical validation .....	93
4.3 Toxicity evaluation .....	94
5. Conclusions.....	96
Acknowledgments .....	97
References .....	97
6. DISCUSSÃO GERAL .....	110
7. CONCLUSÕES .....	116
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	120









## 1. INTRODUÇÃO

O diabetes é um grupo de doenças metabólicas caracterizadas por hiperglicemia resultante de defeitos na secreção de insulina, na ação da insulina, ou ambos. A hiperglicemia crônica de diabetes está associada a danos a longo prazo, com a disfunção e falha de vários órgãos, especialmente os olhos, rins, nervos, coração e os vasos sanguíneos (ADA, 2013).

As duas formas mais comuns de diabetes são o Diabetes Mellitus tipo 1, caracterizada pela menor produção de insulina, e o Diabetes Mellitus tipo 2, na qual ocorre resposta diminuída à insulina e disfunção de células beta pancreáticas. Ambas levam à hiperglicemia, produção excessiva de urina, sede compensatória, aumento da ingestão de líquidos, visão turva, perda de peso inexplicada, letargia e alterações no metabolismo energético (LIN et al., 2010).

A dapagliflozina é a primeira molécula pertencente a uma nova classe de agentes de redução da glicose, as gliflozinas, conhecidas como inibidores do co-transportador de sódio-glicose 2 (SGLT2), usada no tratamento de pacientes com Diabetes Mellitus tipo 2. Pela inibição da proteína SGLT2 nos rins, a dapagliflozina reduz a reabsorção renal de glicose, levando a um aumento na sua excreção urinária e consequente redução nos níveis de glicose no sangue (JABBOUR et al., 2008).

A dapagliflozina é comercializada com o nome de Forxiga®, sob a forma de comprimidos revestidos de 5 e 10 mg de fármaco. O produto é uma marca registrada da indústria Bristol-Myers Squibb Company e teve seu registro aprovado no Brasil em 2013.

Por se tratar de um medicamento recente, o número de dados relacionados às técnicas analíticas para controle de qualidade do produto ainda é reduzido, especialmente no que diz respeito ao monitoramento do ingrediente ativo em estudos de estabilidade, bem como do controle quantitativo e qualitativo de suas substâncias relacionadas. Ambos os estudos são de extrema relevância para garantir um medicamento eficaz e seguro durante seu uso ao longo de todo seu prazo de validade, e a apresentação desses resultados tem se tornado uma exigência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária para o registro de novos produtos (BRASIL, 2013).

Diante disso, torna-se relevante desenvolver e validar métodos analíticos com alta sensibilidade, capazes de identificar a presença de pequenas quantidades de impurezas nas formulações com alta confiabilidade para sua quantificação (AHUJA,

2007). Ademais, qualificar estas substâncias quanto a sua toxicidade também é de extrema importância uma vez que a sua presença pode afetar não apenas os parâmetros de segurança do fármaco, por produzir reações adversas, mas, também, alterar as características originais de solubilidade, interferindo diretamente em sua eficácia terapêutica (ROY, 2002).





## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Desenvolver e validar metodologia analítica indicativa de estabilidade para quantificação da dapagliflozina em comprimidos, que viabilize a identificação e determinação quantitativa de impurezas orgânicas do fármaco, bem como avaliar a possível toxicidade dessas substâncias.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Desenvolver métodos analíticos indicativos de estabilidade para a quantificação de dapagliflozina em comprimidos;
- Validar os métodos analíticos desenvolvidos com base nos parâmetros preconizados na legislação;
- Aplicar os métodos propostos no monitoramento de impurezas orgânicas da dapagliflozina;
- Realizar a avaliação da estabilidade do fármaco frente a condições drásticas de temperatura, luz e estresse químico, a fim de conhecer o perfil de produtos formados e elucidar possíveis rotas de degradação, segundo os guias de estabilidade;
- Realizar estudos de toxicidade in vitro da dapagliflozina, bem como de suas impurezas relacionadas.









### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Diabetes Mellitus

O diabetes é definido como um conjunto de doenças metabólicas caracterizadas por um aumento na concentração de glicose no sangue, hiperglicemia, que acarretam diversas complicações em vários órgãos, como rins, olhos, cérebro e coração. Dentre as suas causas estão defeitos na secreção e/ou ação da insulina, resistência à ação da insulina, entre outros (BRASIL, 2006).

Considerada por muito tempo uma doença de menor importância para a saúde mundial, está tomando o seu lugar como uma das principais ameaças à saúde humana no século 21. As duas últimas décadas têm visto um aumento significativo no número de pessoas diagnosticadas com diabetes em todo o mundo (ZIMMET et al., 2001). Estima-se que, em 1995, a incidência dessa doença atingia 4,0% da população adulta mundial e que, em 2045, alcançará a cifra de 9,9%. De acordo com a Federação Internacional de Diabetes, o Brasil ocupa a quarta posição entre os dez países com o maior número de indivíduos com diabetes e o terceiro lugar em número de crianças e adolescentes com diabetes tipo 1, sendo um total de 12,5 milhões até o ano de 2017 (DE ALMEIDA-PITITTO et al., 2015; CHO et al., 2018).

Existem duas formas principais de diabetes. O *Diabetes Mellitus* tipo 1 (DM1) é considerada resultado da destruição autoimune das células beta pancreáticas, mediada pelos linfócitos T, resultando em deficiência absoluta de insulina. Pessoas com diabetes tipo 1 devem tomar insulina exógena para sobrevivência para prevenir o desenvolvimento de cetoacidose (BARONE et al., 2007). A sua frequência é menor em relação ao diabetes tipo 2, representando 10% do total de casos.

Diferentemente do DM 1, cuja manifestação está mais associada a fatores genéticos e ambientais (ATKINSON, 2012), O Diabetes Mellitus tipo 2 (DM 2) possui relação mais estreita com aspectos comportamentais e de estilo de vida. Apesar do histórico familiar e idade, como exemplos de condições não modificáveis que podem estar relacionados ao aparecimento desta patologia, alguns fatores como obesidade, sedentarismo, tabagismo, hipertensão arterial, dentre outros, têm um papel significativo no aumento da incidência e prevalência do DM2 (LYRA et al., 2006; DEFRONZO et al., 2015).

O DM 2 é caracterizado por altos níveis de glicose em decorrência da resistência à insulina e/ou pela secreção anormal de insulina. Pessoas com diabetes

tipo 2 não são dependentes de insulina exógena, mas seu uso pode ser necessário para manter o controle dos níveis de glicose no sangue se isso não for alcançado apenas com dieta ou antidiabéticos orais. (ZIMMET et al., 2001; BRASIL, 2014). Apesar de ser o tipo de diabetes passível de controle através de mudanças no estilo de vida do paciente, o tratamento farmacológico se faz necessário com o decorrer dos anos, uma vez que as células secretoras de insulina no pâncreas tendem a progredir para um estado de falência parcial ou total, levando a complicações crônicas mais graves, como doença arterial coronariana, cegueira, falência renal, amputação de membros e perda de função e qualidade de vida (BRASIL, 2006).

### **3.2 Fármacos hipoglicemiantes**

Os mecanismos patofisiológicos associados ao DM 2 e que levam a hiperglicemia foram divididos em oito componentes, podendo ocorrer isoladamente ou em combinação, sendo eles: secreção reduzida de insulina pelas células beta, elevada secreção de glucagon pelas células alfa, produção aumentada de glicose no fígado, disfunção neurotransmissora e resistência à insulina no cérebro, lipólise aumentada, aumento da reabsorção renal de glicose, efeito reduzido das incretinas no intestino delgado e comprometimento ou diminuição da captação de glicose em tecidos periféricos, como músculo esquelético, fígado e tecido adiposo. As terapias atualmente disponíveis para a redução da glicemia visam um ou mais dos mecanismos citados, através de monoterapia ou associação de medicamentos (CHAUDHURY et al., 2017).

A metformina, pertencente à classe das biguanidas, é o fármaco mais tradicional usado como hipoglicemiante e até hoje é considerada como primeira escolha para uso contínuo em pacientes com diabetes tipo 2. No entanto, por apresentar efeitos adversos gastrointestinais em cerca de 10% dos pacientes submetidos ao tratamento, além de restrições na sua efetividade por depender de insulina circulante para exercer seu efeito farmacológico, novos fármacos vêm sendo introduzidos como alternativas terapêuticas para o DM 2 (ALVES DA CONCEIÇÃO; NOGUEIRA DA SILVA; BARBOSA, 2017).

A Tabela 1 apresenta um compilado das principais moléculas representantes de cada classe de medicamento antidiabético atualmente aprovadas para o tratamento dessa patologia, com seus respectivos mecanismos de ação e possíveis eventos adversos.

Tabela 1. Agentes farmacológicos para controle da glicemia (adaptado de CHAUDHURY et al., 2017).

Classe	Representantes	Mecanismo de Ação	Efeitos Adversos
Biguanida	Metformina	Sensibilizador de insulina; Inúmeros efeitos sobre a inibição da produção de glicose hepática	Deficiência de vitamina B12, que pode causar anemia e neuropatia (risco em idosos)
Inibidoras da dipeptidil peptidase 4 (DPP-4)	Sitagliptina Saxagliptina Vildagliptina Linagliptina Alogliptina	Inibição da degradação do GLP-1, aumentando a secreção de insulina	Pancreatite; Infecções do trato respiratório superior
Gliflozinas	Canagliflozina Dapagliflozina Empagliflozina	Inibição do cotransportador de glicose (SGLT2) nos rins	Cetoacidose (rara); Micose genital; Aumento de infecções no trato urinário
Agonistas de GLP-1	Liraglutida Exenatida Dulaglutida	Ativação do receptor de GLP1: aumento da secreção de insulina, diminuição do glucagon, retardo do esvaziamento gástrico e aumento da saciedade	Náusea, vômito; Pancreatite; Tumor de células C da tireoide
Sulfonilureias	Glimepirida Glibenclamida Glipizida Gliburida Gliclazida	Secreção de insulina	
Tiazolidinedionas	Rosiglitazona Pioglitazona	Verdadeiro sensibilizador de insulina	Câncer de bexiga; Faturas

Fonte: Autora.

### 3.3 Dapagliflozina

Em indivíduos saudáveis, mais do que 99% da glicose plasmática que é filtrada no glomérulo renal é reabsorvida, resultando em menos do que 1% do total de glicose filtrada sendo excretada na urina. Este processo de reabsorção é mediado por dois cotransportadores de glicose sódio-dependentes (SGLTs): o SGLT1, um transportador expresso no intestino, coração e rins e o SGLT2, um transportador de alta capacidade, que é expresso principalmente nos rins. Estima-se que 90% da reabsorção renal de glicose é facilitada pelo SGLT2 residente na superfície das células epiteliais que

revestem o segmento S1 do túbulo proximal dos néfrons (MENG et al., 2008; e OBERMEIER et al., 2010).

As gliflozinas são uma nova classe de agentes antidiabéticos orais que inibem especificamente o cotransportador de glicose SGLT2 no rim, prevenindo assim a reabsorção de glicose e aumentando a glicosúria em indivíduos diabéticos, reduzindo a hiperglicemia (JABBOUR et al., 2008).

O uso de medicamentos que atuam por este mecanismo tem se tornado uma alternativa vantajosa no tratamento do DM 2, uma vez que a inibição do SGLT2 é independente da insulina e, por isso, o controle da glicose se dá sem efeitos adversos sobre o peso corporal, pressão arterial e com menor risco de hipoglicemia, podendo também ser administrada em conjunto com outros medicamentos hipoglicemiantes (MENG et al., 2008). Porém, como o seu modo de ação depende da função glomerular-tubular renal normal, a eficácia dos inibidores do SGLT2 é reduzida em pessoas com insuficiência renal (KALRA, 2014).

A nomenclatura química para a dapagliflozina é (2S,3R,4R,5S,6R)-2-[4-cloro-3(4- etoxibenzi)fenil]-6-(hidroximetil)tetraidro-2H-pirano-3,4,5-triol; sua fórmula molecular é C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>ClO<sub>6</sub> e possui massa molecular de 408,87g/mol. Apresenta-se sob a forma de pó branco, não higroscópico e solúvel em muitos solventes polares. Possui cinco centros estereogênicos, sendo observada uma única forma polimórfica.

Sua estrutura química está representada na Figura 1 (HAAS ET AL., 2014; SCIFINDER, 2015).

Após a administração oral de dapagliflozina, a concentração máxima no plasma é geralmente atingida dentro de 2 horas, sob jejum. A biodisponibilidade oral absoluta de dapagliflozina, após a administração de uma dose de 10mg, é de 78%. Seu metabolismo é, principalmente, via conjugação do glucuronido mediada pela enzima UDP glucuroniltransferase 1A9 (UGT1A9), sendo extensivamente metabolizada a dapagliflozina 3-O-glucuronido, o qual é um metabólito inativo. A eliminação da dapagliflozina e seus metabólitos se dá principalmente por via renal, correspondendo a 75% da sua excreção. O tempo de meia vida plasmático ( $t_{1/2}$ ) da dapagliflozina é de aproximadamente 12,9 horas após administração de uma dose oral única de Forxiga® 10mg (FDA, 2014).

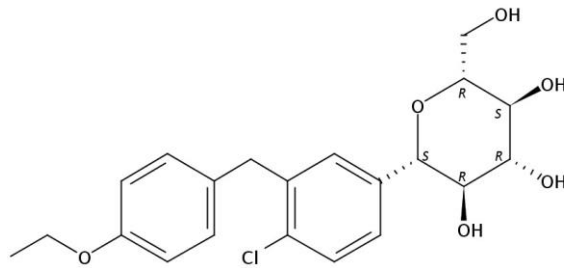


Figura 1. Estrutura química da dapagliflozina.

### 3.3.1 Processo de síntese

A rota de síntese da molécula da dapagliflozina (6) está descrita no trabalho de Meng e colaboradores (2008), e ilustrada na Figura 2.

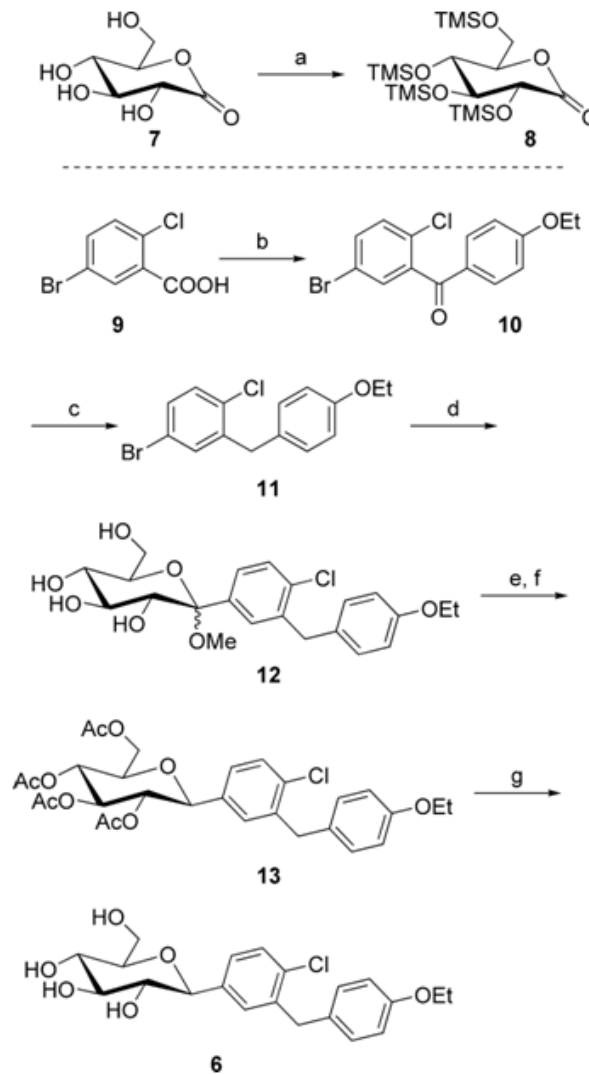


Figura 2. Parte do processo de síntese da dapagliflozina (6) (MENG et al., 2008).

Conforme descrito pelos autores, o precursor na obtenção do fármaco é o produto natural denominado florizina. Obtida da raiz da macieira, esta molécula apresenta-se como um potente agente promotor de glicosúria e poliúria, posteriormente demonstrado ser um inibidor não seletivo de transportadores SGLT nos rins. A partir disso, ao longo dos anos, novos estudos foram realizados visando solucionar a baixa estabilidade metabólica desta molécula e seus primeiros análogos foram obtidos através da eliminação da ligação hidrolisável O-glicosídica. A dapagliflozina foi a precursora da classe das gliflozinas, apresentando uma potente e seletiva inibição do transportador SGLT2 (MENG et al., 2008; ALVES DA CONCEIÇÃO; NOGUEIRA DA SILVA; BARBOSA, 2017).

### 3.3.2 Análise quantitativa e estudos de estabilidade

A Tabela 2 reúne os trabalhos encontrados na literatura acerca do desenvolvimento de métodos analíticos para a quantificação da dapagliflozina tanto em matéria-prima quanto no produto acabado.

Tabela 2. Relação dos trabalhos publicados acerca do desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação de dapagliflozina.

<b>Título da publicação</b>	<b>Referência</b>
Validation of a Newly Developed Stability Indicating RPLiquid Chromatographic Method for the Quantitative Determination of Dapagliflozin	(SURA; MODALAVALASA; KOTHAPALLI, 2018)
Development and Validation of Stability Indicating HPLC Method for Estimation of Dapagliflozin in Marketed Formulation	(NAGLAXMI; GAME, 2018)
A New RP-HPLC Method Development and Validation of Dapagliflozin in Bulk and Tablet Dosage Form	(DEBATA et al., 2017)
Development and Validation of Dapagliflozin By Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography Method and It's Forced Degradation Studies	(SHAKIR BASHA; SRAVANTHI, 2017)

Development and Validation of stability-Indicating RPHPLC method for determination of Dapagliflozin	(MANASA et al., 2014a)
Method Development and Validation of Dapagliflozin in API by RP-HPLC and UV-Spectroscopy	(MANASA et al., 2014b)

Em alguns deles, os pesquisadores avaliaram a estabilidade do fármaco frente a condições forçadas de estresse, a fim de determinar a influência dos produtos de degradação na análise do mesmo. No entanto, em nenhum destes estudos foi realizada a identificação dos produtos eventualmente formados.

### 3.4 Controle de impurezas em produtos farmacêuticos

Para que um produto farmacêutico esteja apto a ser utilizado é necessário garantir a sua qualidade. Dentre vários fatores, destaca-se a importância de o medicamento ser eficaz para a função pretendida, bem como ser seguro para o paciente que dele fará uso, não causando nenhuma reação adversa inesperada ou qualquer tipo de toxicidade.

Cabe aos fabricantes de medicamentos assegurarem que seus produtos sejam capazes de satisfazer todos os requisitos de qualidade durante todo o seu prazo de validade. Para tanto, realizam-se os testes de estabilidade nos produtos a fim de prever o comportamento dos mesmos, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade (BRASIL, 2010).

Além disso, as empresas estão cada vez mais atentas para o controle sobre o perfil de impurezas dos seus produtos, uma vez que a presença de substâncias estranhas na formulação pode alterar as características originais do medicamento, podendo afetar diretamente sua segurança e eficácia.

Com essa preocupação, vêm se tornando crescentes as exigências frente à concessão e renovação de registro de novos produtos farmacêuticos pelas agências reguladoras, onde são cobrados dos fabricantes estudos completos a respeito do perfil de impurezas dos seus produtos.

O International Council on Harmonization (ICH) dispõe de dois principais guias que tratam desse tema. O guia Q3A(R2), Impurities in New Drug Substances, orienta sobre os estudos do perfil de impurezas dos ingredientes farmacologicamente ativos, além de estabelecer os limites para notificação, identificação e qualificação dessas

impurezas quando da solicitação/renovação de registro junto aos órgãos reguladores (Tabela 3). O guia aborda tais impurezas sob duas perspectivas: os aspectos químicos, que incluem, por exemplo, a classificação e identificação das impurezas e uma breve discussão sobre os procedimentos analíticos; e os aspectos de segurança, que fornecem orientações específicas para a qualificação das impurezas presentes na amostra em questão.

Tabela 3. Limites de notificação, identificação e qualificação de impurezas em substâncias ativas

<b>Dose Diária Máxima<sup>1</sup></b>	<b>Limite de notificação<sup>2,3</sup></b>	<b>Limite de identificação<sup>3</sup></b>	<b>Limite de qualificação<sup>3</sup></b>
≤ 2g/dia	0,05%	0,10% ou 1 mg da ingestão diária (o que for menor)	0,15% ou 1 mg da ingestão diária (o que for menor)
> 2g/dia	0,03%	0,05%	0,05%

<sup>1</sup> Quantidade máxima da substância ativa administrada por dia;

<sup>2</sup> Limites de notificação maiores devem ser cientificamente justificados; menores podem ser apropriados se a impureza for usualmente não tóxica.

<sup>3</sup> Limites

Fonte: (ICH Q3A (R2), 2006).

Em seu outro guia, Q3B(R2), Impurities in New Drug Products, o ICH complementa as instruções a respeito do controle de impurezas ao tratar dos produtos acabados. Neste guia são abordadas, especificamente, as impurezas classificadas como produtos de degradação. Dentro dessa categoria estão incluídos, além dos produtos de degradação derivados do fármaco, os produtos de reações da substância ativa com os excipientes da formulação e/ou com os materiais de embalagem do produto (ICH Q3B(R2), 2006).

De acordo com o ICH, as impurezas podem ser classificadas em três categorias principais: resíduos de solventes, impurezas inorgânicas e impurezas orgânicas (relacionadas ao próprio fármaco ou ao processo de produção) (ICH Q3A(R2), 2006). Neste contexto, inúmeras substâncias podem ser incluídas, dentre elas: reagentes de partida, isômeros, intermediários de síntese, reagentes, solventes, catalisadores e produtos de degradação (ROY, 2002).



### 3.4.1 Resíduos de solventes

Os solventes são líquidos orgânicos e inorgânicos usados como veículos para a preparação de soluções ou suspensões na síntese de uma nova substância farmacêutica ou na produção de um medicamento. Estes solventes podem não ser completamente eliminados e permanecer como resíduos no produto final na forma de impurezas. Muitos dos solventes utilizados industrialmente na síntese de novas moléculas e nos processos produtivos são conhecidamente tóxicos. Dependendo do seu possível risco à saúde humana, estes resíduos são divididos em três classes (Tabela 4).

Tabela 4. Classificação dos solventes com base nos seus limites permitidos.

<b>Classes</b>	<b>Tipo de solventes</b>	<b>Limites</b>
Classe I	Agentes cancerígenos humanos conhecidos, agentes fortemente carcinogênicos para humanos e solventes nocivos ao meio ambiente.	Solventes a serem evitados.
Classe II	Agentes carcinogênicos não genotóxicos ou possíveis agentes causadores de outras toxicidades irreversíveis, como neurotoxicidade ou teratogenicidade. Solventes suspeitos de outras toxicidades significativas, porém reversíveis.	Solventes em níveis limitados.
Classe III	Solventes com baixo potencial tóxico para o homem; nenhum limite de exposição com base na saúde é necessário.	Solventes com baixo potencial tóxico.

Fonte: (ICH Q3C, 2006).

### 3.4.2 Impurezas inorgânicas

As impurezas inorgânicas podem também ser derivadas de processos de síntese e produção de matérias-primas. Estas são normalmente conhecidas e identificadas, e incluem, principalmente: reagentes, reagentes ligantes, catalisadores, metais pesados ou outros metais residuais e sais inorgânicos. As impurezas inorgânicas são normalmente detectadas e quantificadas utilizando procedimentos farmacopeicos já estabelecidos ou outros métodos apropriados (ICH Q3A(R2), 2006; PILANIYA et al., 2010).

### 3.4.3 Impurezas orgânicas

As impurezas orgânicas são as impurezas mais comumente encontradas nos produtos farmacêuticos. Elas podem ser originadas durante a síntese do fármaco, do processo de produção ou da estocagem do produto. Mesmo que os produtos acabados sejam lavados com solventes, há sempre uma chance de algumas substâncias dos materiais de partida que não reagiram permanecerem no produto final.

As impurezas de um fármaco ou de uma nova entidade química são originadas, principalmente, durante o processo de síntese a partir de matérias-primas, solventes, intermediários e subprodutos. As matérias-primas são geralmente fabricadas com requisitos de pureza inferiores aos da substância ativa, e, portanto, podem conter um número de componentes que pode afetar a pureza do produto farmacêutico.

Do mesmo modo, os solventes utilizados na síntese são suscetíveis de conter certo número de impurezas que podem variar de níveis muito baixos até quantidades bastante significativas. Além disso, algumas impurezas dos medicamentos podem surgir de interações com os excipientes utilizados para formular um produto farmacêutico (AHUJA, 2007).

Outra potencial fonte de formação de impurezas orgânicas nos medicamentos é devida a processos de degradação. Durante a produção do medicamento, o fármaco é submetido a uma variedade de condições que podem levar a sua decomposição. Por exemplo, se o calor for usado para a secagem ou por outras razões, pode facilitar a degradação de fármacos termicamente lábeis. Soluções e suspensões são potencialmente propensas à degradação devido à hidrólise ou solvólise. Estas reações também podem ocorrer na forma farmacêutica sólida, tal como no caso de cápsulas e comprimidos, quando a água ou outro solvente for utilizado para a granulação (AHUJA, 2007). Neste contexto, a realização dos estudos de estabilidade do produto torna-se imprescindível para que se consiga prever o comportamento do fármaco frente aos diversos fatores de degradação, identificando e quantificando os eventuais produtos formados e avaliando sua possível toxicidade.

A ANVISA, em resolução publicada em dezembro de 2015 (RDC 53/2015), estabelece os “parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares”, onde também orienta sobre como conduzir os estudos de degradação forçada nos produtos (BRASIL, 2015). Os limites

previstos nesta resolução são compatíveis com os preconizados pelo ICH em seu guia Q3B (R2), e estão demonstrados na Tabela 5.

Uma vez que a estabilidade de um produto farmacêutico depende de vários fatores, desde as condições ambientais como temperatura, umidade e luz, e os fatores relacionados ao produto, como as propriedades químicas e físicas da substância ativa e dos excipientes, a forma farmacêutica e sua composição, o processo de produção e as propriedades dos materiais de embalagem, os estudos de estabilidade devem incluir a avaliação do comportamento do fármaco nas condições mais adversas. (KOPP, 2006).

Conduzir os estudos de estabilidade sob condições exageradas de temperatura, umidade e luz, por exemplo, pode ajudar a determinar quais potenciais impurezas podem ser geradas por reações de degradação, e auxiliar no controle de qualidade a fim de minimizar seu aparecimento durante os processos de produção e armazenagem dos medicamentos (AHUJA, 2007).

Tabela 5. Limites de notificação, identificação e qualificação para produtos de degradação (BRASIL, 2015).

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

Dados: 1 - Quantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia 2 - Limites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a ingestão total diária (ITD) de um produto de degradação.

### 3.5 Qualificação de impurezas

Segundo o guia Q3B(R2) do ICH, qualificação é o processo de aquisição e avaliação de dados que estabelece a segurança biológica de uma impureza individual ou de um determinado perfil de impurezas no nível especificado. O guia recomenda que os estudos de avaliação de segurança para qualificar uma impureza devem comparar nova substância medicamentosa contendo uma quantidade representativa da nova impureza com material previamente qualificado. Ainda, estudos de avaliação de segurança usando uma amostra da impureza isolada também podem ser considerados (ICH Q3B (R2), 2006).

Ensaio *in vitro* de citotoxicidade e genotoxicidade devem ser conduzidos com o propósito de elucidar o perfil toxicológico das potenciais impurezas relacionadas ao fármaco e/ou produto farmacêutico e prever as consequências de uma exposição a estes agentes. Além disso, ferramentas *in silico*, como os softwares computacionais, são utilizados como instrumento para determinação preliminar de impurezas com potencial genotóxico ou citotóxico a partir de informações relacionadas às características estruturais da molécula com base na identificação dos grupamentos químicos que são potencialmente tóxicos (MC-GOVERN e JACOBSON-KRAM, 2006).

Para sistemas de cultura de células *in vitro*, um composto ou tratamento é considerado citotóxico se interfere na célula a ponto de alterar significativamente sua morfologia, afetar adversamente a taxa de crescimento celular ou até mesmo causar a morte da célula.

Ao longo dos últimos anos, muitos métodos de ensaio vêm sendo descritos para a avaliação da viabilidade das células com base em diferentes parâmetros do metabolismo celular. É importante salientar que ensaios de viabilidade celular e de citotoxicidade possuem diferenças com relação aos resultados que fornecem, podendo ser utilizados isolados ou complementares um ao outro (NILES; MORAVEC; RISS, 2014).

A premissa científica por trás dos ensaios de viabilidade baseados em ATP e metabolismo celular é que a atividade metabólica é proporcional ao número de células viáveis. Desta forma, afere-se que uma redução na atividade após o tratamento (quando comparado com o controle) é o resultado da citotoxicidade. Por outro lado, os ensaios de citotoxicidade medem parâmetros proporcionais ao grau de morte

celular. Durante a maioria dos eventos de citotoxicidade, as medidas de viabilidade e citotoxicidade são inversamente proporcionais, ou seja, as medidas de viabilidade são altas quando as medidas de citotoxicidade são baixas e vice-versa (NILES; MORAVEC; RISS, 2014).

Em 2014, o ICH publicou o guia M7(R1): Avaliação e controle de impurezas reativas de DNA (mutagênicas) em produtos farmacêuticos para limitar o risco potencial de câncer. No intuito de complementar os guias Q3B(R2) e Q3A(R2), o objetivo deste é fornecer uma estrutura prática que seja aplicável à identificação, categorização, qualificação e controle dessas impurezas para limitar o risco carcinogênico em potencial (ICH M7, 2014).

O guia M7(R1) descreve a avaliação de risco das impurezas mutagênicas, a partir de uma análise inicial das reais e potenciais impurezas pela realização de buscas em bancos de dados e pesquisas bibliográficas sobre carcinogenicidade e mutagenicidade bacteriana para classificá-las como Classe 1, 2 ou 5, de acordo com a Tabela 6. Se os dados para tal classificação não estiverem disponíveis, o guia recomenda realizar uma avaliação das relações estrutura-atividade que se concentre nas previsões de mutagenicidade bacteriana, o que poderia levar a uma classificação na classe 3, 4 ou 5.

### 3.5.1 Ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade

. O ensaio de viabilidade baseado no metabolismo celular através da redução do sal MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il) -2,5-difenil tetrazolio) é considerado como o primeiro exemplo de um sal de tetrazólio que foi usado no desenvolvimento de um ensaio de viabilidade de múltiplos poços para células de mamíferos. O ensaio de MTT baseia-se na redução do sal de tetrazólio solúvel, de coloração amarela, em um produto insolúvel de cor azul pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase . A redução do anel de tetrazólio do MTT leva à formação de cristais de formazan, substância impermeável às membranas celulares que se acumula nas células saudáveis (MOSMANN, 1983). O ensaio MTT é extremamente bem caracterizado e referenciado até os dias de hoje na literatura, e é frequentemente um padrão ouro com o qual novos métodos de ensaio de viabilidade/citotoxicidade são comparados.

Tabela 6. Classificação das impurezas em relação ao potencial mutagênico e carcinogênico com resultados de ações de controle.

Classe	Definição	Proposta de ação para controle
1	Carcinogenicidade e mutagenicidade conhecida	Controle dos níveis permitidos ou abaixo do limite aceitável específico do composto
2	Mutagênicos conhecidos com potencial carcinogênico desconhecido (mutagenicidade bacteriana conhecida*, ausência de dados de carcinogenicidade em roedores)	Controle dos níveis permitidos ou abaixo dos limites aceitáveis (TTC** apropriado)
3	Alerta estrutural, estrutura não relacionada com a substância farmacológica; ausência de dados sobre mutagenicidade	Controle dos níveis permitidos ou abaixo dos limites aceitáveis (TTC** apropriado) ou conduzir ensaio de mutagenicidade bacteriana Se não mutagênico = classe 5 Se mutagênico = classe 2
4	Alerta estrutural, mesmo alerta na substância farmacológica ou compostos relacionados com o fármaco (por exemplo, intermediários no processo) que foram testados e não são mutagênicos	Tratar como impureza não mutagênica
5	Ausência de alerta estrutural ou estrutura de alerta com dados suficientes que demonstram falta de mutagenicidade ou carcinogenicidade	Tratar como impureza não mutagênica

\* Ou outros dados relevantes de mutagenicidade positiva indicativos de reatividade no DNA relacionados com a indução de mutações genéticas (por exemplo, resultados positivos em estudos *in vivo* de mutações genéticas).

\*\* TTC “threshold of toxicological concern”.

Fonte: (ICH M7, 2014).

O ensaio do Vermelho Neutro baseia-se na absorção do vermelho neutro, um corante supravital, e seu acúmulo nos lisossomas de células viáveis não lesionadas. A capacidade das células em incorporar o corante relaciona-se diretamente com a viabilidade das mesmas. Este ensaio tem sido usado para mensurar a citotoxicidade relativa de uma gama de agentes, incluindo surfactantes, medicamentos, neurotoxinas, poluentes aquáticos, dentre outros (ARBO et al., 2014).

Sabe-se que espécies reativas, também chamadas de radicais livres, contribuem de forma significativa para o desenvolvimento de doenças relacionadas à idade e processos de envelhecimento. A fim de prever o desenvolvimento de possíveis patologias relacionadas a estas entidades químicas, empregam-se alguns métodos para medir a formação de tais substâncias a nível celular. Um deles é a utilização de sondas fluorescentes como a Diclorodihidrofluoresceína (DCFH), que pode ser utilizada como marcador oxidativo tanto no meio intracelular quanto no extracelular. As células vivas incorporam a 2,7-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), a qual é enzimaticamente hidrolisada por esterases intracelulares a 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH), que não é fluorescente. Na presença de espécies reativas, a DCFH é oxidada a forma 2,7-diclorofluoresceína (DCF), que é fluorescente (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004; SILVEIRA et al., 2004).

A avaliação do potencial mitocondrial também contribui para a avaliação de testes toxicológicos. As mitocôndrias podem sofrer apoptose através de alterações que ocorrem no potencial interno da membrana. Mudanças em diversos fatores como bomba de prótons e fosforilação oxidativa podem ser deletérias para a célula. O ensaio com etil ester tetrametilrodamina (TMRE) é utilizado para avaliar o potencial de membrana mitocondrial. Os derivados fluorescentes de certos compostos lipofílicos, como o TMRE, concentram-se no interior das mitocôndrias mantendo o potencial de membrana interior. Portanto, a captação de TMRE pode ser usada para determinar quantitativamente o potencial transmembrana mitocondrial em células vivas (MITRA & LIPPINCOTT-SCHWARTZ, 2010; ZOROVA et al., 2018).

Já os compostos genotóxicos são aqueles que causam danos ao DNA, que poderia levar à mutação do código genético. A possibilidade de um composto genotóxico ser cancerígeno depende de testes in vivo. A abordagem mais utilizada é avaliar compostos genotóxicos conhecidos como potenciais carcinógenos (ROBINSON et al., 2010).

O ensaio cometa é um dos métodos padrões para avaliar os danos ao DNA em células eucarióticas. Apresenta como vantagens a simplicidade do método, sensibilidade, versatilidade, rapidez e economia, sendo um teste bastante utilizado para avaliar a segurança de medicamentos. Este ensaio é aplicado na área de toxicologia genética para avaliar genotoxicidade tanto in vitro quanto in vivo, podendo-se utilizar células humanas, de animais ou plantas (ROJAS et al., 1999; COLLINS, 2004; VASQUEZ, 2010). O fundamento do teste consiste na análise da migração

eletroforética do DNA obtidos após lise celular em uma fina camada de agarose. Combina a técnica de eletroforese em gel com microscopia fluorescente. Durante o ensaio, as células são incorporadas em um gel e são espalhadas em uma lâmina. Posteriormente, são lisadas com o uso de detergentes e alta força iônica e, posteriormente, submetidas a uma corrente elétrica que age como uma força proporcionando a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras. Ao final do teste, as células que apresentam núcleo redondo são consideradas normais e as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA (AFANASIEVA & SIVOLOB, 2018).

### 3.5.2 Ensaio de genotoxicidade

Os testes de genotoxicidade podem ser definidos como testes *in vitro* e *in vivo* destinados a detectar compostos que induzem dano genético por diversos mecanismos (ICH S2(R1), 2011).

Uma das técnicas mais empregadas para detecção de genotoxicidade tem sido o Teste Cometa, uma vez que este consegue detectar lesões pré-mutagênicas. O Teste Cometa, ou teste de células individualizadas em gel de agarose, é uma técnica útil para o estudo de danos e reparos no DNA. As células, englobadas em gel e espalhadas sobre uma lâmina, são submetidas a uma corrente elétrica que age como uma força que proporciona a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano detectável no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA (HARTMANN et al., 2003).

### **3.6 Metodologia analítica para análise de fármacos e impurezas relacionadas**

Uma ampla gama de métodos está disponível para monitorar as impurezas nos produtos farmacêuticos. O critério principal para a escolha do melhor método é a capacidade deste de diferenciar todos os compostos presentes em uma determinada amostra. Este requisito reduz a escolha a métodos essencialmente espectroscópicos e de separação ou, ainda, uma combinação de ambos. Além disso, com relação à



determinação de impurezas em produtos farmacêuticos, seja na matéria-prima ou no produto acabado, demanda-se por métodos analíticos suficientemente sensíveis, isto é, que sejam capazes de detectar com confiabilidade quantidades muito pequenas dessas substâncias nas amostras.

Os principais métodos espectroscópicos dos quais se pode fazer uso nesse tipo de análise são a espectrofotometria no ultravioleta (UV) e no infravermelho (IV), a espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectrometria de massas (EM). Em geral, IV, RMN e EM são excelentes técnicas de caracterização de impurezas que foram previamente isoladas. Já a espectrofotometria na região do UV é mais utilizada para analisar amostras por cromatografia líquida de alta eficiência, sendo esta combinação comumente empregada nas análises farmacêuticas (RAMACHANDRA, 2017).

Dentre os métodos de separação, os mais utilizados são a cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE), eletroforese capilar (EC) e cromatografia de fluido supercrítico (CFS). Com exceção da eletroforese capilar, todas as demais são técnicas cromatográficas (HOLM; ELDER, 2016).

### 3.6.1 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica com vasta aplicação na área química e farmacêutica. É um processo físico utilizado na separação, identificação e quantificação de cada constituinte de uma mistura, cujo fundamento depende da interação entre a fase estacionária, o analito e a fase móvel. O solvente que compreende a fase móvel é impulsionado por uma bomba de alta pressão fazendo com que a amostra migre de acordo com as interações e as propriedades físico-químicas da fase móvel e da fase estacionária, a qual está contida no interior da coluna cromatográfica. Após a separação dos componentes da mistura de acordo com suas interações em maior ou menor grau com a fase estacionária, estes são direcionados para o detector, onde um software capta o sinal gerado em função do tempo de análise, gerando um cromatograma que relaciona a área do sinal com a concentração do analito (LANÇAS, 2009; NOGUEIRA et al., 2011).

É um método que oferece grandes benefícios em termos de conveniência, precisão, velocidade e capacidade de realizar separações difíceis. O fato de poder ser utilizada com diferentes tipos de detectores, como fluorescência, arranjo de diodos,

espectrometria de massas, dentre outros, agrega mais uma vantagem ao seu uso (SHAH et al., 2012). O uso da CLAE como método de separação acoplado a alguma técnica de identificação, como espectrometria de massas ou ressonância magnética nuclear, tem se tornado uma escolha acertada para quantificação e identificação de impurezas e substâncias relacionadas em produtos farmacêuticos, e atualmente encontra-se bastante inserida na rotina dos laboratórios de controle de qualidade.

### 3.6.2 Cromatografia líquida de ultraeficiência

A partir da necessidade de se aumentar a eficiência das separações cromatográficas juntamente com uma redução no tempo de análise, o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência foi aprimorado pelos fabricantes resultando no que se conhece hoje por cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE).

Com mecanismo de separação similar à CLAE, o sistema de CLUE se diferencia principalmente no tamanho das partículas que compreendem a fase estacionária, as quais foram reduzidas a diâmetros menores que 1,8  $\mu\text{m}$ , bem como no comprimento das colunas cromatográficas (tipicamente  $\leq 5$  cm). Para suportar as elevadas pressões geradas por partículas de diâmetro muito pequeno (abaixo de 3  $\mu\text{m}$ ), foi necessário estabelecer um novo sistema capaz de operar com partículas de menor tamanho, uma vez que suporta pressões mais elevadas que a CLAE convencional. Além do aumento da eficiência das colunas, a diminuição do tamanho das partículas traz um benefício adicional: permite operar-se com fases móveis a elevada velocidade linear média sem perda significativa de eficiência e com um reduzido tempo de análise (LANÇAS, 2011). Neste sistema, o volume de injeção da amostra deve ser pequeno, entre 0,1 e 50  $\mu\text{L}$ , a fim de evitar o espalhamento da amostra resultando no alargamento do pico cromatográfico (MALDANER; SALES; JARDIM, 2009).

Como consequência das mudanças cromatográficas observadas nos cromatógrafos de ultraeficiência, outra vantagem desta técnica é a redução no uso de solventes orgânicos, aspecto diretamente ligado ao custo das análises e ao seu impacto no meio ambiente pela geração de resíduos (NOGUEIRA et al., 2011).

### 3.6.3 Eletroforese Capilar

A eletroforese é um método físico de análise baseado na migração de solutos carregados, dissolvidos em uma solução eletrolítica, sob influência de uma corrente elétrica. Quando este fenômeno ocorre no interior de um tubo capilar, com dimensões que podem variar entre 15 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 40 a 100 cm de comprimento, denomina-se eletroforese capilar (EC), sendo considerada como uma das mais eficientes técnicas de separação disponíveis para a análise de moléculas grandes e pequenas (SEKHON, 2011).

Os eletrodos conectados a uma fonte de energia são colocados nos compartimentos dos eletrodos para gerar uma diferença de voltagem nestes compartimentos. Como resultado, um campo elétrico é criado no capilar que permite a migração de moléculas carregadas. Os cátions migram em direção ao eletrodo carregado negativamente (cátodo), enquanto os ânions são atraídos em direção ao eletrodo carregado positivamente (ânodo). Um detector é colocado ao final do capilar e é geralmente conectado a um sistema de processamento de dados. O sistema de controle de temperatura é a chave para manter um desempenho consistente; portanto, o capilar, os compartimentos de eletrólito, o sistema de detecção (na coluna) e os frascos de amostras (carrossel) são alojados em um ambiente de temperatura controlada (ALTRIA, 2005).

Assim como outras técnicas de separação analítica, a eletroforese capilar também pode variar quanto ao modo de separação efetuando-se pequenas variações de condições como o eletrólito de corrida, tipo de capilar utilizado e tipo de detecção. Com relação ao sistema de detecção, o modo mais comum se dá pelo método espectrofotométrico de absorção na região ultravioleta (UV ou UV-vis), o qual depende da presença de grupos cromóforos na molécula a ser analisada. No entanto, são muitos os tipos de detecção que podem ser utilizados pela técnica de EC, como por exemplo: emissão por fotodiodo, fluorescência, quimiluminescência, ressonância magnética nuclear, detecção condutométrica sem contato, dentre outros (SEKHON, B. S., 2011).

A eletroforese capilar também possui diferentes classificações de acordo com o modo de separação, destacando-se a eletroforese capilar de zona (capillary zone electrophoresis – CZE), cromatografia eletrocinética micelar (micellar electrokinetic chromatography – MEKC) e cromatografia eletrocinética de microemulsão (MEEKC).

Embora a CZE seja, amplamente, o modo mais utilizado, em alguns casos sua aplicação na separação de analitos não se faz possível. Uma vez que o princípio dessa técnica consiste na eluição dos compostos através da sua ionização, muitas vezes não há formação de espécies carregadas. Nessas situações, é possível recorrer a alguma das variantes da técnica, como é o caso da MEKC e da MEEKC.

O diferencial destas últimas consiste, principalmente, na utilização de um agente tensoativo junto ao eletrólito. A presença de surfactantes no tampão acima da concentração micelar crítica (CMC) cria uma fase pseudoestacionária que permite separações de compostos neutros que não seriam adequadamente separados pelo método tradicional (CZE).

Aditivos como CDs, reagentes de pares de íons, uréia, solventes orgânicos e íons metálicos modificam a fase aquosa. A fase pseudoestacionária micelar e a fase tampão aquosa circundante migram a uma velocidade diferente e a partição de solutos neutros entre as duas fases, permitindo, assim, a separação eficiente entre os analitos (HANSEN & SHERIBAH, 2005).

Assim como a CLUE, a eletroforese capilar é uma técnica que apresenta como principal vantagem o uso de quantidades reduzidas de amostra e de solventes, contribuindo para uma análise mais sustentável e menos onerosa. No entanto, como desvantagem, está a maior dificuldade em alcançar a reprodutibilidade do método (AHUJA, 2007; ALTRIA, 2005).

### **3.7 Validação da metodologia analítica**

No controle de qualidade de medicamentos, tão importante quanto o resultado em si é assegurar a confiabilidade do resultado obtido em determinada análise. Logo, é indispensável proceder com a validação do método analítico, após o desenvolvimento do mesmo, de forma a comprovar que os resultados por ele gerados são confiáveis e que o método proposto é adequado para realizar as análises a que se destina.

De acordo com a RDC 166 de 2017 da ANVISA, a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limites de detecção e quantificação e exatidão adequados à análise (BRASIL, 2017).

Os métodos analíticos são divididos em quatro categorias, e, de acordo com a sua finalidade, são pré-definidos quais parâmetros devem ser avaliados durante a validação.

Os ensaios quantitativos para determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas se enquadra na categoria II da RDC 166/2017 para a qual se determina que o método seja validado nos seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, repetibilidade e precisão intermediária, limite de quantificação e exatidão (BRASIL, 2017).

Para proceder com a validação de uma metodologia analítica, é indispensável fazer uso de substâncias de referência oficializadas pela Farmacopeia Brasileira ou, na ausência destas, por outros códigos autorizados pela legislação vigente. No caso da inexistência dessas substâncias, admite-se o uso de padrões de trabalho, desde que a identidade e o teor sejam devidamente comprovados (BRASIL, 2017).



---

**4      CAPÍTULO I. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS  
ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE  
DAPAGLIFLOZINA EM COMPRIMIDOS**

---





## **4 CAPÍTULO I. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE DAPAGLIFLOZINA EM COMPRIMIDOS**

### **4.1 Introdução**

A garantia da qualidade de um medicamento perpassa todo o seu processo de fabricação, desde a chegada da matéria-prima até a liberação do produto acabado. Cabe ao laboratório de controle de qualidade monitorar cada uma das etapas deste processo para que, ao final, se obtenha um produto que atenda às especificações de eficácia e segurança pré-estabelecidas pelos órgãos reguladores.

Um dos aspectos fundamentais para demonstrar a qualidade de um medicamento é a quantificação da substância ativa presente na formulação. O teor de fármaco no produto final deve atender os critérios de aceitação, caso contrário o medicamento poderá ter seu efeito farmacológico comprometido ou, ainda, causar algum tipo de toxicidade decorrente de uma superdosagem.

Um procedimento analítico é desenvolvido para testar uma característica definida do fármaco ou medicamento contra critérios de aceitação estabelecidos para essa característica. No início do desenvolvimento de um novo procedimento analítico, a escolha da instrumentação analítica e da metodologia deve ser selecionada com base na finalidade pretendida e no escopo do método (FDA, 2015). Além disso, o método desenvolvido deve ser validado, de modo a fornecer dados suficientes para comprovar que a metodologia proposta é adequada e fornece resultados confiáveis (BRASIL, 2017).

Considerando que a dapagliflozina é um medicamento recente e a literatura a respeito das técnicas para análise de teor do fármaco é escassa, o objetivo deste capítulo foi desenvolver e validar dois métodos analíticos com diferentes fundamentos para a quantificação da dapagliflozina em comprimidos, traçando um paralelo comparativo entre as duas técnicas, com suas vantagens e desvantagens para aplicação na rotina dos laboratórios de controle de qualidade.

### **4.2 Materiais**

#### **4.2.1 Substância química de referência (SQR) de dapagliflozina**

A substância química de referência da dapagliflozina foi adquirida por importação da empresa Ontario Chemicals, Inc. (Canadá). A SQR apresenta-se na forma de pó branco, com grau de pureza de 98,4%, atestado pelo laudo do fornecedor.

#### 4.2.2 Produto farmacêutico

Os comprimidos revestidos de dapagliflozina 10mg (Forxiga®), da marca Bristol-Myers Squibb Company, utilizados nos ensaios analíticos foram adquiridos no comércio local. Os excipientes presentes nos comprimidos são: celulose microcristalina, lactose anidra, crospovidona, dióxido de silício, estearato de magnésio, álcool polivinílico, dióxido de titânio, macrogol, talco e óxido férrico amarelo.

#### 4.2.3 Solução amostra

A amostra utilizada no desenvolvimento e validação dos métodos foi preparada a partir dos comprimidos de Forxiga® que foram pesados para determinação do peso médio e posteriormente finamente pulverizados com gral e pistilo. A extração da dapagliflozina da sua forma farmacêutica foi realizada pela dissolução do pó dos comprimidos em acetonitrila por 30 minutos em banho de ultrassom. Em seguida, o volume do balão volumétrico foi completado com o mesmo solvente e a solução foi filtrada usando papel filtro.

#### 4.2.4 Solução placebo

A solução placebo foi preparada pela pesagem dos excipientes contidos nos comprimidos de Forxiga®, nas quantidades indicadas pelo Handbook of Pharmaceutical Excipients (ROWE; SHESKEY, 2006), seguida do mesmo procedimento realizado no preparo na solução amostra.

### 4.3 Desenvolvimento do método por CLAE

O equipamento utilizado no desenvolvimento do método por CLAE foi o cromatógrafo líquido da marca Agilent, modelo LC 1200 series, equipado com uma bomba quaternária, um autoinjeter, compartimento com termostato e detector de arranjo de diodos. O sistema utilizado para aquisição de dados e análise de resultados foi o software ChemStation (Versão B03.02).

#### 4.3.1 Ensaios preliminares

A etapa precedente ao desenvolvimento do método cromatográfico para a quantificação da dapagliflozina foi a determinação do solvente mais adequado para a solubilização da SQR, bem como para a extração da substância ativa da sua forma farmacêutica. Em paralelo, as soluções foram submetidas a uma varredura em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo 1800), a fim de verificar o(s) comprimento(s)

de onda de maior absorção do fármaco para posterior aplicação na análise cromatográfica. O desenvolvimento do método se deu a partir dos testes de composição de fase móvel concomitante à escolha da coluna cromatográfica.

A acetonitrila mostrou-se o solvente mais adequado para a solubilização da SQR de dapagliflozina e para sua extração da forma farmacêutica. A solução dissolvida em acetonitrila apresentou boa absorção na região do ultravioleta, onde foi escolhido o comprimento de onda de 230 nm como melhor opção para a detecção do fármaco.

A composição da fase móvel inicialmente testada foi uma mistura de partes iguais de água e acetonitrila (50:50, v/v) e uma coluna de separação do tipo C18 de 150 mm de comprimento. Foi preparada uma solução estoque de dapagliflozina SQR a 100 µg/mL em acetonitrila, posteriormente diluída a 20 µg/mL, filtrada em filtro de 0,45 µm de diâmetro e injetada no sistema cromatográfico.

A partir deste ponto, inúmeras modificações foram conduzidas, tanto na composição/proporção da fase móvel quanto no tipo de fase estacionária, a fim de alcançar as melhores condições analíticas para a quantificação da dapagliflozina em comprimidos. Dentre os testes realizados, destaca-se o uso de modificadores orgânicos como ácido fosfórico, alterações na vazão e na proporção dos componentes da fase móvel e polaridade do recheio da fase estacionária. Neste último aspecto, foram testadas colunas clássicas (C8 e C18) de marcas e tamanhos variados, bem como colunas com algum grupo polar embutido, como fenil e ciano. Após avaliar os cromatogramas e os parâmetros cromatográficos da análise do fármaco em cada uma das condições testadas, o método foi definido conforme consta na (Tabela 7). O cromatograma correspondente está ilustrado na Figura 3.

Com base no resultado obtido nestas condições, o método foi considerado definido, podendo ser iniciada a validação analítica do mesmo.

Tabela 7. Condições cromatográficas definidas para o método de quantificação de dapagliflozina em comprimidos.

<b>Parâmetro</b>	<b>Descrição</b>
Equipamento	CLAE Agilent, LC 1200
Fase móvel	Acetonitrila:água (65:35, v/v)

Vazão da fase móvel	1,0 ml/min
Detecção	Detector DAD 230 nm
Coluna cromatográfica	Fenil (4,6 x 250 mm, 5 µm), Waters
Temperatura da coluna	25 °C
Volume de injeção	20 µL
Diluyente	Acetonitrila: água (50:50, v/v)

Fonte: Autora

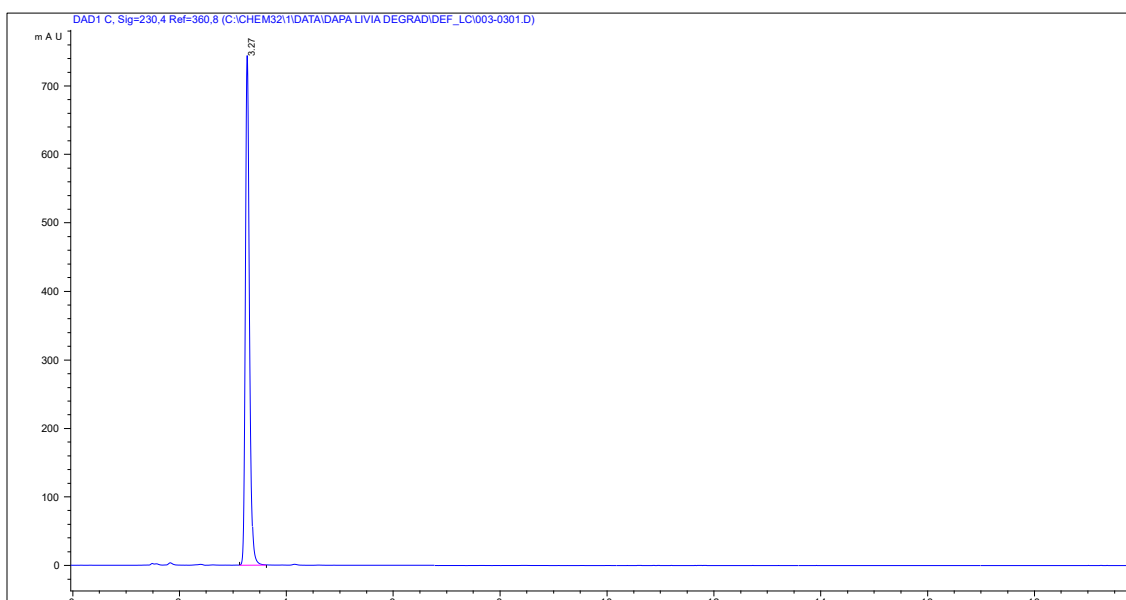


Figura 3. Cromograma representativo da injeção de dapagliflozina SQR 100 µg/mL. Condições cromatográficas: fase móvel ACN: água (65:35, v/v), vazão 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL. Coluna: fenil (4,6 x 250 mm, 5 µm), 25 °C.

#### 4.3.2 Validação do método analítico por CLAE

A validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência foi efetuada conforme previsto na legislação vigente através da avaliação dos seguintes parâmetros analíticos: especificidade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez (BRASIL, 2017).

#### 4.3.2.1 Teste de especificidade/seletividade

A especificidade do método foi avaliada pela injeção da solução placebo contendo todos os excipientes presentes na formulação dissolvidos em acetonitrila e o cromatograma foi comparado com a solução do padrão de dapagliflozina.

Além disso, estudos de degradação forçada dos comprimidos de dapagliflozina foram conduzidos para verificar a possível interferência dos produtos de degradação na quantificação da substância ativa.

A solução amostra foi preparada conforme descrito no item 4.2.3 e submetida às seguintes condições de degradação: para degradação ácida, alcalina e oxidativa, alíquotas de 5 mL da solução estoque foram transferidas para balões volumétricos de 20 mL, adicionados 5 mL de HCl 1M ou NaOH 1M ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% e o volume final completado com o diluente. Para avaliação da fotoestabilidade do fármaco, alíquotas da mesma solução estoque foram colocadas em câmaras espelhadas (100 x 18 x 17 cm) equipadas com lâmpadas UVA (352 nm) e UVC (254 nm). Para degradação térmica, alíquota da solução estoque foi mantida em estufa a uma temperatura de 60 °C. A cada hora, durante cinco horas, uma alíquota de cada solução, em todas as condições de estresse, foi diluída e injetada no sistema cromatográfico na concentração de 100 µg/mL. Todas as amostras foram filtradas usando filtros de membrana de 0,45 µm antes de serem injetadas.

#### 4.3.2.2 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação da dapagliflozina foram estabelecidos com base nos dados de desvio padrão do intercepto (s) e inclinação média (I), obtidos a partir das três curvas padrão, conforme as equações abaixo (BRASIL, 2017).

Cálculo do Limite de Detecção:

$$LD = (3,3 \cdot s) / I$$

Cálculo do Limite de Quantificação:

$$LD = (10 \cdot s) / I$$

#### 4.3.2.3 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada pela construção de três curvas padrão, em três diferentes dias, nas quais foram efetuadas três determinações de cada concentração.

Para a construção das curvas padrão, foi preparada uma solução estoque de dapagliflozina SQR na concentração de 500 µg/mL. A partir desta solução, sucessivas diluições foram realizadas obtendo-se as concentrações finais conforme demonstrado na Tabela 8.

Tabela 8. Diluições de dapagliflozina SQR para construção da curva padrão.

<b>Volume de solução estoque (500 µg/ml)</b>	<b>Volume final</b>	<b>Concentração</b>
0,6 mL	10 mL	30 µg/mL
1,0 mL	10 mL	50 µg/mL
2,0 mL	10 mL	100 µg/mL
2,5 mL	10 mL	125 µg/mL
3,0 mL	10 mL	150 µg/mL
3,5 mL	10 mL	175 µg/mL

Fonte: Autora

#### 4.3.2.4 Precisão (repetibilidade e precisão intermediária)

Para verificar a precisão intradia do método (repetibilidade) foram preparadas, individualmente, seis soluções amostra a partir do pool de comprimidos de dapagliflozina. As soluções amostra do produto farmacêutico foram preparadas conforme descrito no item 4.2.3, pesando-se quantidade de pó equivalente a 10 mg do fármaco dissolvidos em balão volumétrico de 20 mL, obtendo-se uma solução

estoque de 500 µg/mL. Esta solução foi diluída e injetada na concentração de 100 µg/mL, correspondente ao ponto médio da curva padrão.

A solução de dapagliflozina SQR também foi injetada a uma concentração final de 100 µg/mL.

Para verificação da precisão intermediária, o procedimento foi o mesmo da repetibilidade, sendo executado em três dias distintos.

A precisão do método foi avaliada pela análise dos desvios padrão relativos (DPR) entre as análises de um mesmo dia (repetibilidade) e também entre as análises dos três dias, para a verificação da precisão intermediária.

#### 4.3.2.5 Exatidão

A análise da exatidão do método foi realizada através da adição de concentração conhecida de dapagliflozina SQR à solução amostra. A concentração da solução amostra foi mantida constante, sendo modificadas as concentrações do padrão adicionado em três níveis dentro da faixa de linearidade: concentração baixa (R1), média (R2) e alta (R3), conforme ilustrado na Tabela 9. Também foram injetadas a solução amostra e a solução padrão individualmente. Todas as amostras foram preparadas em triplicata, e cada uma analisada três vezes.

Tabela 9. Preparo das soluções para avaliação da exatidão pelo teste de recuperação.

	<b>Volume de solução amostra de dapagliflozina 500 µg/mL* (mL)</b>	<b>Volume de solução de dapagliflozina SQR 500 µg/mL* (mL)</b>	<b>Concentração final (µg/mL)</b>
Amostra	1,0 mL	-	100,0
R1	1,0 mL	0,25 mL	125,0
R2	1,0 mL	0,50 mL	150,0
R3	1,0 mL	0,75 mL	175,0
Padrão	-	1,0 mL	100,0

\* Alíquotas adicionadas em balões volumétricos de 5 mL.

Para o cálculo da exatidão foi utilizada a equação descrita abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

#### 4.3.2.6 Robustez

A robustez do método desenvolvido para a análise de dapagliflozina em comprimidos foi avaliada através da observação do perfil cromatográfico após alterações em alguns parâmetros do sistema cromatográfico.

Para cada modificação efetuada, a amostra foi injetada três vezes, e a média dos resultados comparados com a condição normal. Na Tabela 9 estão expostas as alterações definidas para a verificação da robustez do método.

Tabela 10. Alterações nas condições do método cromatográfico para avaliação da robustez.

<b>Parâmetro</b>	<b>Condição normal</b>	<b>Alteração 1</b>	<b>Alteração 2</b>
Vazão da fase móvel	1,0 ml/min	0,8 ml/min	1,2 ml/min
Proporções da fase móvel acetoneitrila: água (v/v)	65:35 (v/v)	63:37 (v/v)	67:33 (v/v)
Temperatura da coluna	25°C	23°C	27°C

#### 4.3.3 Resultados e discussão

##### 4.3.3.1 Especificidade

Ao desenvolver-se um método para a quantificação de fármacos em produtos farmacêuticos, é necessário garantir que o método seja capaz de separar, de forma confiável, o(s) analito(s) de interesse sem interferência dos excipientes da formulação, bem como dos produtos de degradação eventualmente formados.

O que se espera é que na amostra do placebo não ocorra formação de nenhum pico cromatográfico, especialmente no tempo de retenção próximo ao do fármaco.

Além disso, a confirmação da seletividade do método deve ser feita pela injeção da amostra degradada sob diferentes condições, a fim de verificar se os produtos de degradação formados interferem na quantificação da substância de



interesse. O uso do detector de arranjo de diodos é uma ferramenta válida para confirmar a pureza e a identidade do pico do fármaco.

Abaixo estão representados os cromatogramas correspondentes aos estudos de degradação forçada dos comprimidos de dapagliflozina (Figura 4).

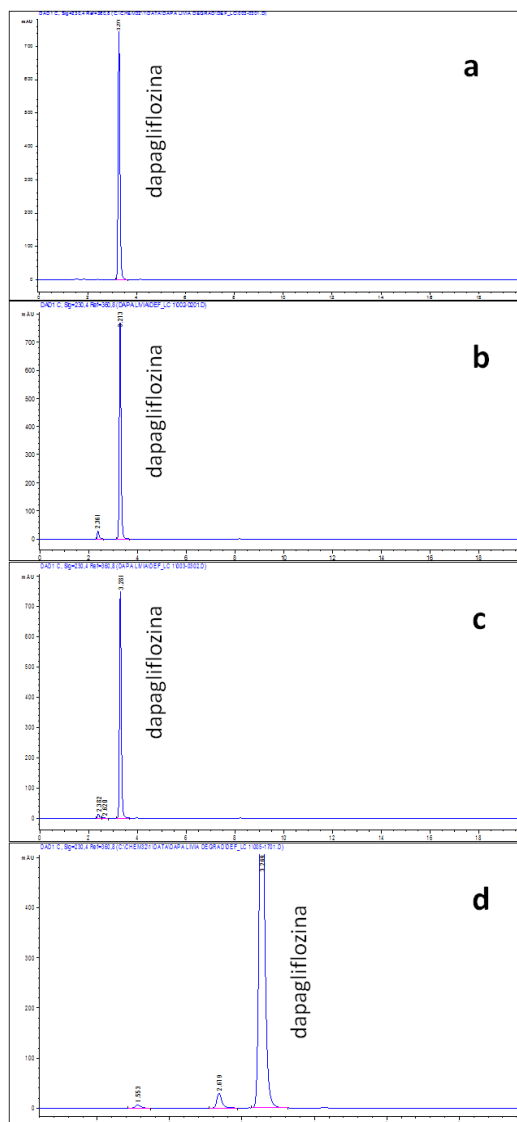


Figura 4. Cromatogramas representativos dos estudos de degradação forçada das soluções de comprimidos de dapagliflozina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , nas seguintes condições: amostra não degradada (a); degradação em meio ácido (HCl 1M, 5h) (b); degradação em meio alcalino (NaOH 1M, 5h) (c) e degradação oxidativa ( $\text{H}_2\text{O}_2$  3%, 5h) (d).

Como se pode observar nos cromatogramas acima, o fármaco mostrou-se suscetível às degradações em meio ácido, alcalino e oxidativo, originando novas entidades químicas após a exposição de 5 horas. No entanto, os produtos de degradação formados não interferem na quantificação da dapagliflozina, comprovando que o método desenvolvido apresenta seletividade adequada. Sob as condições de radiação e calor, a amostra se manteve estável ao longo de todo período

de análise. Os dados de pureza do pico do fármaco foram adquiridos pelo software do próprio equipamento, e confirmaram que não há interferência ou coeluição com outras substâncias

#### 4.3.3.2 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação do método, obtidos através dos dados da curva padrão, foram de 2,2 e 6,5 µg/mL, respectivamente. Tais valores representam que o método possui sensibilidade adequada para a determinação e quantificação da dapagliflozina em amostras de comprimidos.

#### 4.3.3.3 Linearidade

A verificação da linearidade de um método analítico deve compreender, primeiramente, uma análise visual do gráfico da curva padrão, com o objetivo de detectar um possível desvio de linearidade. Além disso, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para comprovação da relação linear entre as respostas analíticas e a concentração do analito na amostra.

A avaliação da linearidade foi realizada pela análise de regressão linear, na qual foi determinada a equação da reta pelo método dos mínimos quadrados, com análise de variância para confirmar a linearidade do método.

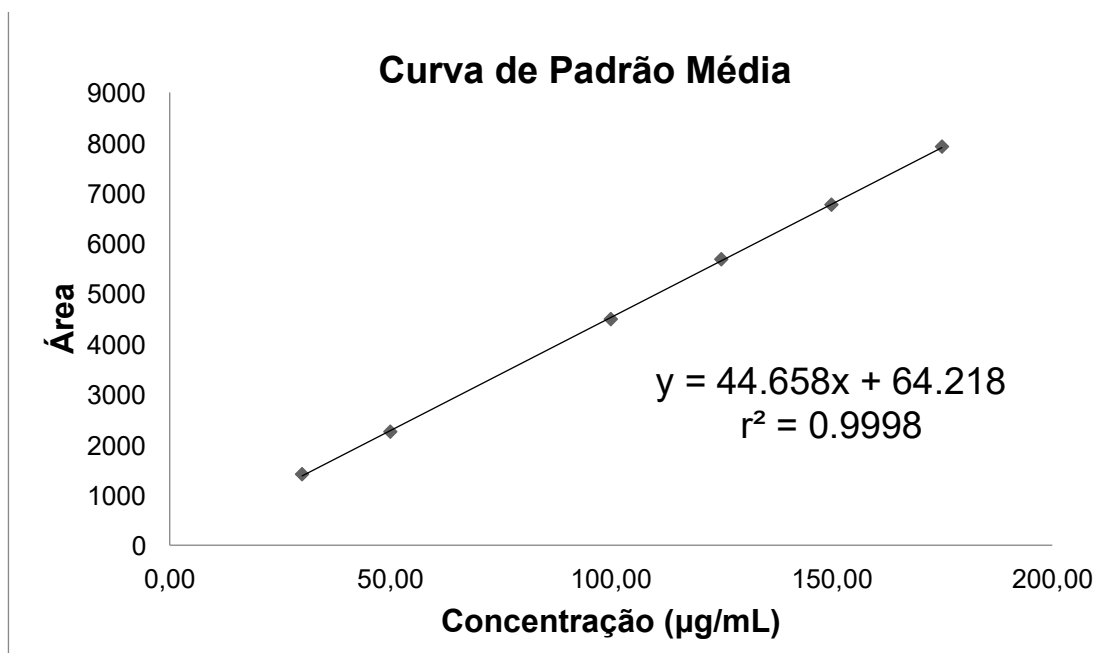


Figura 5. Representação gráfica da curva padrão da dapagliflozina obtida pelo método de cromatografia líquida de alta eficiência

A Figura 5 mostra a representação gráfica da curva padrão obtida através do método, bem como a equação da reta e o coeficiente de determinação ( $r^2$ ).

A Tabela 11 apresenta os resultados correspondentes à análise de regressão linear ( $p \leq 0,05$ ) dos dados determinados a partir da curva padrão média da dapagliflozina.

Tabela 11. Estatística de regressão linear da dapagliflozina.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999937399
R-Quadrado	0,999874802
R-quadrado ajustado	0,999843502
Erro padrão	31,85544335
Observações	6

ANOVA

	<i>Gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>			
Regressão	1	32417102,26	32417102,26	31945,29356	5,87823E-09			
Resíduo	4	4059,077083	1014,769271					
Total	5	32421161,33						

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	25,4198	29,4681	0,8626	0,4370	-56,3967	107,2363	-56,3967	107,2363
Variável X 1	45,0119	0,2518	178,7325	0,0000	44,3127	45,7111	44,3127	45,7111

A Tabela 12 apresenta os dados para o cálculo do resíduo padronizado de regressão linear, realizado sobre os resultados obtidos na linearidade.

Tabela 12. Resíduos da regressão linear obtidos a partir dos resultados da linearidade da dapagliflozina.

<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
1	1375,776042	32,22395833	1,1309678
2	2276,013542	-22,01354167	-0,772611686
3	4526,607292	-39,60729167	-1,390101459
4	5651,904167	26,09583333	0,915888324
5	6777,201042	-10,20104167	-0,358027078
6	7902,497917	13,50208333	0,4738841

A Figura 6 representa os resíduos obtidos a partir da curva de regressão linear da dapagliflozina.

O estudo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados forneceu uma equação da reta  $y = 44.658x + 64.218$ , com um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9998.

A análise do gráfico dos resíduos permite afirmar que não há tendência nos mesmos, sendo aleatoriamente distribuídos com ausência de amostras atípicas, de maneira que se pode afirmar haver homocedasticidade. Os resíduos padronizados também são adequados, uma vez que se encontram todos contidos no intervalo entre +2 e -2.

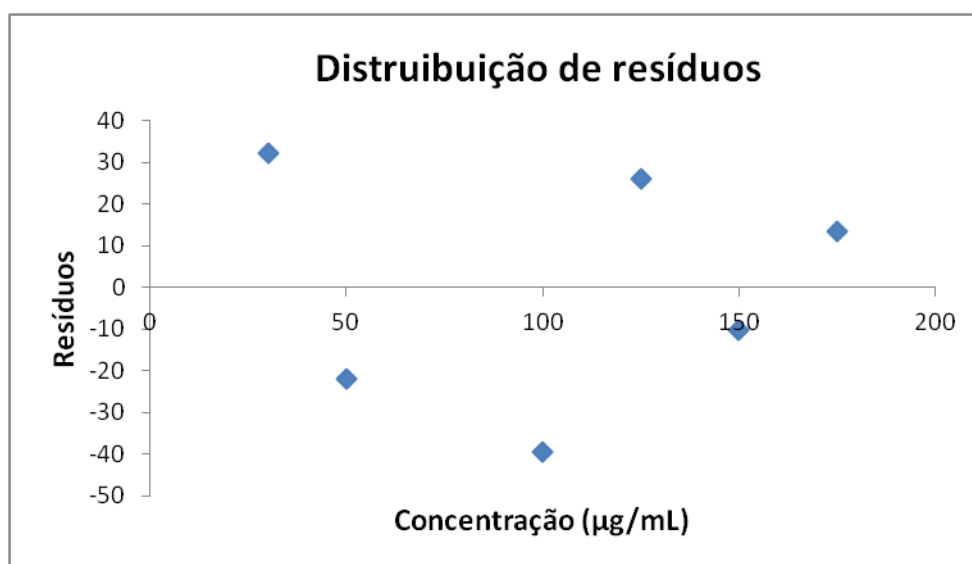


Figura 6. Representação gráfica da distribuição residual de regressão linear da dapagliflozina.

A ANOVA da regressão apresenta elevada significância ( $F$  de significação =  $5,88E-09$ ). Além disso, o intercepto, no intervalo de confiança, contém o zero, enquanto que o coeficiente angular é significativamente diferente de zero.

Deste modo, comprova-se que o método proposto possui relação linear entre a área e a concentração do analito no intervalo avaliado.

#### 4.3.3.4 Precisão

O estudo completo da precisão do método foi conduzido por três dias, sendo cada dia avaliado individualmente para verificação da repetibilidade. Ao final das três

análises, as médias dos DPR foram relacionadas para compor o resultado da precisão intermediária.

A Tabela 13 apresenta os valores experimentais obtidos na determinação da dapagliflozina em comprimidos nos três diferentes dias.

Tabela 13. Resultados obtidos nos testes de repetibilidade e precisão intermediária.

<b>REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA</b>				
	<b>DIA 1 (µg/mL)</b>	<b>DIA 2 (µg/mL)</b>	<b>DIA 3 (µg/mL)</b>	
	<b>INTERDIAS</b>			
AMOSTRA 1	95,81	96,89	96,08	
AMOSTRA 2	97,16	96,24	97,89	
AMOSTRA 3	96,15	96,57	97,38	
AMOSTRA 4	97,44	96,27	96,11	
AMOSTRA 5	97,83	95,54	97,78	
AMOSTRA 6	97,32	96,63	96,21	
<b>MÉDIA</b>	96,95	96,36	96,91	96,74
<b>DPR %</b>	0,82	0,48	0,89	0,76

Fonte: Autora

Os baixos valores de DPR obtidos na avaliação da precisão intra e inter dias demonstram que não houve variação significativa entre as análises realizadas em um mesmo dia, bem como entre os três dias, indicando que o método é preciso em seus resultados.

#### 4.3.3.5 Exatidão

Os resultados encontrados no teste de recuperação estão apresentados na Tabela 14.

Os valores encontrados no teste de recuperação da dapagliflozina encontram-se dentro dos limites considerados adequados para comprovação da exatidão do método analítico, bem como os valores dos DPR em cada nível de concentração avaliado. A recuperação média foi de 101,25%, considerada satisfatória e demonstra que o método proposto é exato.

Tabela 14. Percentuais de recuperação da amostra em três níveis de concentração.

TESTE DE RECUPERAÇÃO				
	CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (µg/ml)	CONCENTRAÇÃO EXPERIMENTAL (µg/ml)	RECUPERAÇÃO (%)	RECUPERAÇÃO MÉDIA   DPR (%)
R1	125,00	123,89	99,12	99,12   0,44
	125,00	123,37	98,69	
	125,00	124,45	99,56	
R2	150,00	150,86	100,57	101,67   1,08
	150,00	152,50	101,66	
	150,00	154,16	102,78	
R3	175,00	180,90	103,37	102,98   1,47
	175,00	177,28	101,30	
	175,00	182,45	104,26	

#### 4.3.3.6 Robustez

A Tabela 15 traz os resultados avaliados no teste de robustez do método frente às modificações propostas.

A avaliação da robustez do método cromatográfico indicou que este resiste a pequenas modificações nas condições cromatográficas propostas, visto que não houve prejuízo na quantificação do fármaco ou quaisquer alterações significativas nos parâmetros cromatográficos.

#### 4.3.4 Conclusão

Após a finalização dos ensaios e interpretação dos resultados de cada parâmetro avaliado, é possível afirmar que o método desenvolvido para a determinação da dapagliflozina em comprimidos atendeu aos requisitos necessários para garantir o seu uso de forma confiável. Logo, pode-se afirmar que o método desenvolvido por cromatografia líquida de alta eficiência está validado, conforme preconizado pelos guias oficiais.

Tabela 15. Resultados obtidos na avaliação da robustez do método.

Alteração	Teor (%)	Tempo de		Assimetria (min)
		retenção	N	
Vazão 0,8 mL/min	97,02	4,17	11081	0,75
Vazão 1,2 mL/min	97,99	2,27	8345	0,80
Fase móvel acetonitrila:água (63:37, v/v)	98,62	3,40	10026	0,78
Fase móvel acetonitrila:água (67:33, v/v)	98,50	3,25	10146	0,78
Temperatura 23 °C	99,50	3,32	9907	0,78
Temperatura 27 °C	101,46	3,33	9945	0,79

#### 4.4 Desenvolvimento de método por EC

Para o desenvolvimento do método de quantificação de dapagliflozina em comprimidos pela técnica de EC, foi utilizado equipamento da marca Agilent 3DCE, equipado com injetor automático, controlador de temperatura e detector de arranjo de fotodiodos. O tratamento dos dados foi realizado pelo software ChemStation CE.

Uma das primeiras etapas do desenvolvimento do método por eletroforese capilar foi estabelecer a composição do eletrólito capaz de identificar a presença do fármaco na solução de trabalho. Uma vez que não se encontra na literatura, até o presente momento, estudos relacionados à determinação de dapagliflozina por EC, foram testados diversos tipos de sistemas tamponantes com base nos trabalhos publicados por Paliosa e colaboradores (2015), Barden e colaboradores (2014) e Garcia e colaboradores (2005), variando suas concentrações e faixa de pH. Em paralelo, também foi investigado o efeito da voltagem aplicada no sistema (do cátodo ao ânodo), numa faixa de 10 a 30 kV (BARDEN et al., 2014; GARCIA et al., 2005; PALIOSA et al., 2015).

Os sistemas tamponantes testados ao longo do desenvolvimento do método foram:

- Tampão fosfato de sódio monobásico 50 mM, pH 7,90;
- Tampão fosfato de sódio monobásico 50 mM pH 10,02;
- Tampão fosfato de sódio monobásico 10 mM, pH 3,46;
- Tampão fosfato de sódio monobásico 25 mM + SDS 50 mM, pH 11,08;
- Tampão Tris 50 mM + SDS 50 mM, pH 9,67;
- Tampão Tris 100 mM, pH 9,43;
- Tampão Tris 100 mM, pH 4,65;
- Tampão ácido bórico 100 mM, pH 5,49;
- Tampão tetraborato de sódio 50 mM pH 9,6;
- Tampão tetraborato de sódio 50 mM pH 5,38;
- Tampão tetraborato de sódio 50 mM pH 10,48;
- Tampão tetraborato de sódio 10 mM + SDS 10 mM pH 5,38;
- Tampão tetraborato de sódio 20 mM + SDS 20 mM, pH 10,33;
- Tampão tetraborato de sódio 20 mM + 1% acetato de etila + 1,2% SDS + 2,4% butanol + pH 10,35;

Depois de estabelecida a composição do eletrólito que apresentou melhor resultado para a determinação da dapagliflozina, foi realizada a escolha da substância que desempenhará a função de padrão interno (PI) na análise, cuja finalidade é compensar erros de injeção e pequenas flutuações do tempo de migração do analito de interesse. As substâncias testadas foram a ampicilina, o atenolol, a bupivocaína, a lincomicina, a cloroquina e a ranitidina.

Todos os experimentos foram conduzidos em capilar de sílica fundida com 50 µm de diâmetro interno e 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo). As amostras testadas ao longo do desenvolvimento do método foram introduzidas no capilar por injeção hidrodinâmica a 50 mBar por 5 segundos. A detecção do fármaco foi fixada em 230 nm.

No início de cada dia de análise, bem como entre cada injeção, era realizado um pré-condicionamento do capilar, a fim de estabilizar o mesmo e evitar a adsorção da amostra em seu interior. Tal procedimento é fundamental para se garantir a reprodução dos resultados.



#### 4.4.1 Ensaios preliminares

A partir da solução estoque de dapagliflozina SQR, preparada pela dissolução do padrão do fármaco em acetonitrila a uma concentração final de 1,0 mg/mL, foram realizadas diluições com cada eletrólito a ser testado no desenvolvimento do método. As soluções para análise foram injetadas no sistema de EC a uma concentração de 75 µg/mL, sempre passando por filtro em membrana de nylon de 0,45 µm de diâmetro de poro anterior a injeção. As soluções utilizadas no précondicionamento (NaOH 0,1M, água e eletrólito) eram filtradas da mesma maneira.

Os testes com os diferentes tipos de tampões, concentrações e faixas de pH demonstraram a dificuldade inicial em se obter uma intensidade adequada no pico da dapagliflozina, com simetria satisfatória. O que se observava nos primeiros testes era o aparecimento de picos largos e pouco intensos. Somente com o tampão tetraborato de sódio foi possível melhorar tais características, conforme demonstrado na Figura 7.

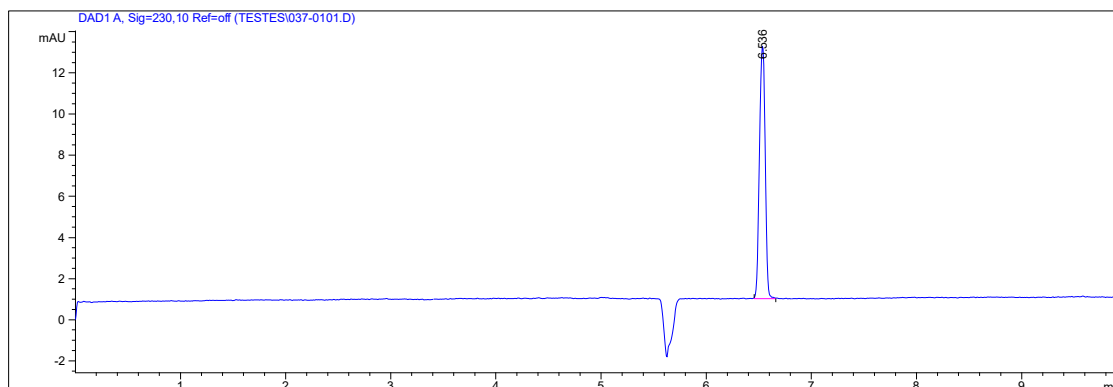


Figura 7. Eletroferograma obtido da injeção de dapagliflozina SQR 75 µg/mL. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 48 cm; tampão tetraborato de sódio 50 mM (pH 10,5 ajustado com NaOH) como eletrólito de corrida; tensão aplicada de 20 kV; temperatura de análise de 25°C e detecção a 230 nm.

Apesar deste resultado parecer bastante promissor, ainda se fez necessário algumas modificações em consequência da corrente gerada pela aplicação de 20 kV de voltagem na análise. O controle da corrente elétrica gerada ao longo da corrida é importante não somente para evitar dificuldades de reprodutibilidade dos tempos de migração devido ao aquecimento (AHUJA, 2007), como também para evitar o desgaste prematuro do capilar, levando a perda da sua funcionalidade. Como medida de prevenção interna do laboratório, se estabeleceu um limite máximo de corrente de 80 mA. Uma vez que na análise representada no eletroferograma acima, a corrente

atingiu 79,8 mA, foi preciso modificar as condições do método para reduzir este valor e ainda assim obter uma análise satisfatória. Com base nisso, foram executadas consecutivas alterações na voltagem aplicada, na concentração do tampão e também na temperatura do capilar na busca por aperfeiçoar a análise sem comprometer o sistema e seus componentes.

Conforme se estabeleciam as condições de análise da dapagliflozina, também eram testados os candidatos a padrões internos (PI) do método. O uso de padrão interno em análises por EC são altamente recomendados para garantir a repetibilidade das injeções. Além disso, também são usados para aumentar a precisão na identificação de compostos através dos tempos de migração relativos (AHUJA, 2007).

O eletroferograma representado na Figura 8 mostra o resultado da injeção da dapagliflozina juntamente com a ranitidina, a qual foi escolhida como padrão interno para o método proposto. A solução estoque do padrão interno foi preparada pela dissolução da ranitidina SQR em água ultrapura a uma concentração de 1 mg/mL, posteriormente diluída no eletrólito a 75 µg/mL junto com o fármaco e injetada no sistema.

As condições finais estabelecidas para o método estão descritas na Tabela 16.

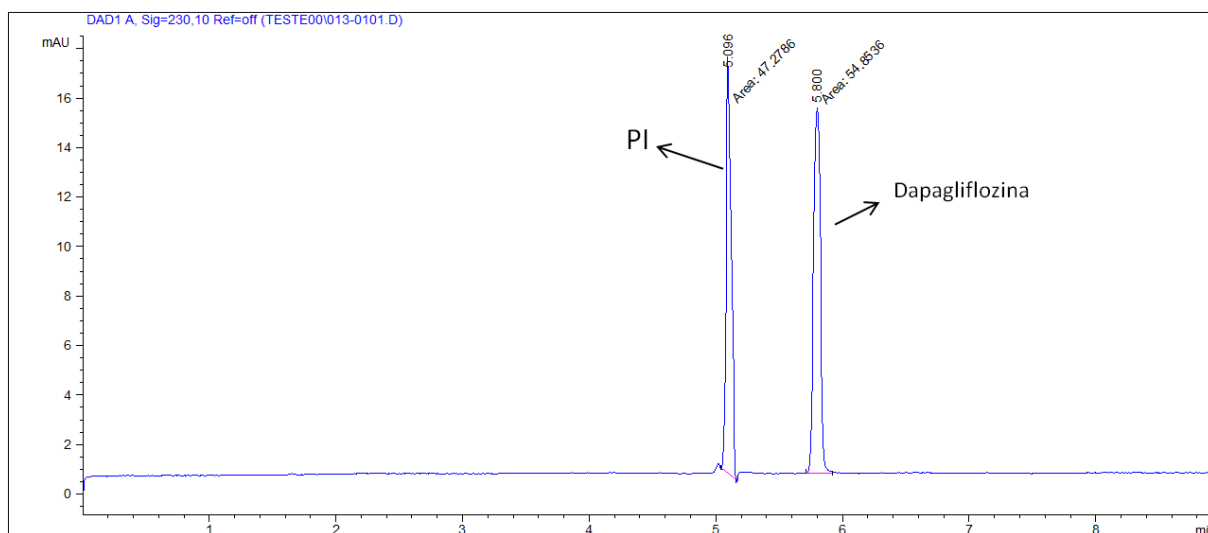


Figura 8. Eletroferograma obtido da injeção de dapagliflozina SQR 75 µg/mL + PI 75 µg/mL. Condições eletroforéticas: capilar de sílica fundida de 48 cm; tampão tetraborato de sódio 40 mM (pH 10,5 ajustado com NaOH) como eletrólito de corrida; tensão aplicada de 14 kV; temperatura do capilar 25°C e detecção a 230 nm.

Tabela 16. Condições eletroforéticas estabelecidas para a determinação de dapagliflozina em comprimidos.

<b>Parâmetros</b>	<b>Descrição</b>
Capilar	Sílica fundida com 48,5 cm de comprimento (40 cm efetivos) e 50 µm de diâmetro interno
Temperatura	25 °C
Pré-condicionamento	3 min NaOH 0,1 M; 1,5 min H <sub>2</sub> O; 3 min eletrólito
Eletrólito	Tetraborato de sódio 40 mM, pH 10,5
Injeção	Hidrodinâmica, 50 mBar/5 seg
Tensão aplicada	14 kV
Detecção	230 nm

#### 4.4.2 Validação do método analítico por EC

A validação do método desenvolvido por eletroforese capilar foi conduzida conforme disposto na RDC 166/2017 (BRASIL, 2017), onde foram avaliados os parâmetros de especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

##### 4.4.2.1 Especificidade

A seletividade do método foi avaliada de modo semelhante a do método desenvolvido por CLAE, onde foi verificada a influência dos excipientes presentes no produto comercial, bem como dos produtos de degradação eventualmente formados sob condições forçadas de estresse.

Soluções amostra preparadas a partir dos comprimidos de dapagliflozina foram submetidas às condições de degradação em meio ácido, básico e oxidativo, sob radiação UVA e UVC e calor. A cada hora, durante cinco horas, uma alíquota de cada solução, em todas as condições de estresse, foi diluída a 100 µg/mL no eletrólito, acrescida do PI a uma concentração de 75 µg/mL e injetada no sistema de

EC. Todas as amostras foram filtradas usando filtros de membrana de 0,45 µm antes de serem injetadas.

#### 4.4.2.2 LOD e LOQ

Os limites de detecção e quantificação para a dapagliflozina foram estabelecidos através dos dados da curva padrão, utilizando as mesmas fórmulas utilizadas para o método por CLAE.

#### 4.4.2.3 Linearidade

A linearidade foi determinada pela construção de três curvas padrão, cada uma com seis concentrações de dapagliflozina SQR (50, 75, 100, 125, 150 e 175 µg/mL), preparadas em triplicata, acrescidas do PI a uma concentração fixa de 75 µg/mL em todos os pontos. A curva padrão foi obtida pela média das curvas de três dias.

#### 4.4.2.4 Precisão

A precisão do método foi estabelecida pelos estudos da repetibilidade e precisão intermediária. Ambas foram determinadas pelo cálculo do desvio padrão relativo (DPR) da razão entre as áreas da solução amostra de dapagliflozina (100 µg/mL) e as áreas do padrão interno (75 µg/mL). As seis soluções amostra de dapagliflozina foram preparadas individualmente, de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.3 e injetadas em triplicata.

#### 4.4.2.5 Exatidão

A análise da exatidão foi conduzida através da recuperação de quantidades conhecidas de dapagliflozina SQR adicionadas à solução amostra, a qual foi mantida a uma concentração constante de 100 µg/mL. As quantidades adicionadas de padrão de dapagliflozina foram de 25, 50 e 75 µg/mL, além do PI a uma concentração de 75 µg/mL. Cada solução foi preparada em triplicata e injetada três vezes. Os percentuais de recuperação foram calculados frente à quantidade de padrão adicionada (Tabela 17).

#### 4.4.2.6 Robustez

Para verificação da robustez do método analítico por EC, foram executadas pequenas variações em determinadas condições do método (Tabela 18) e os resultados das respostas comparados com as condições normais.

Tabela 17. Preparo das soluções para avaliação da exatidão pelo teste de recuperação.

Nível	Concentração da solução amostra (µg/mL)	Concentração do PI (µg/mL)	Concentração de padrão adicionado (µg/mL)	Concentração final de dapagliflozina (µg/mL)
R1	100,0	75,0	25,0	125,0
R2	100,0	75,0	50,0	150,0
R3	100,0	75,0	75,0	175,0

Fonte: Autora

Tabela 18. Modificações nos parâmetros do método de eletroforese capilar para avaliação da robustez.

Parâmetro do método	Condição normal	Alteração 1	Alteração 2
Temperatura	25 °C	23 °C	27 °C
Tempo de injeção	5 seg	4 seg	6 seg
Voltagem aplicada	14 kV	13,5 kV	14,5 kV

#### 4.4.3 Resultados e Discussão

##### 4.4.3.1 Especificidade

A análise visual dos eletroferogramas referentes a cada hora de degradação em cada uma das condições descritas anteriormente não possibilitou identificar a formação de nenhum pico resultante da degradação do fármaco. No entanto, quando realizada a quantificação do mesmo, notou-se um decréscimo bastante significativo no seu teor quando submetida às degradações em meio alcalino (próximo de 50%) e oxidativo (em torno de 20%) em comparação com a amostra não degradada na mesma concentração. Por outro lado, a amostra não apresentou decréscimo de teor muito pronunciado

frente ao calor, radiação e meio ácido. O gráfico a seguir (Figura 9) ilustra o decaimento na concentração do fármaco em cada uma das condições de degradação forçada. A pureza dos picos do fármaco foi verificada e indicou que não houve coeluição com nenhum eventual produto formado.

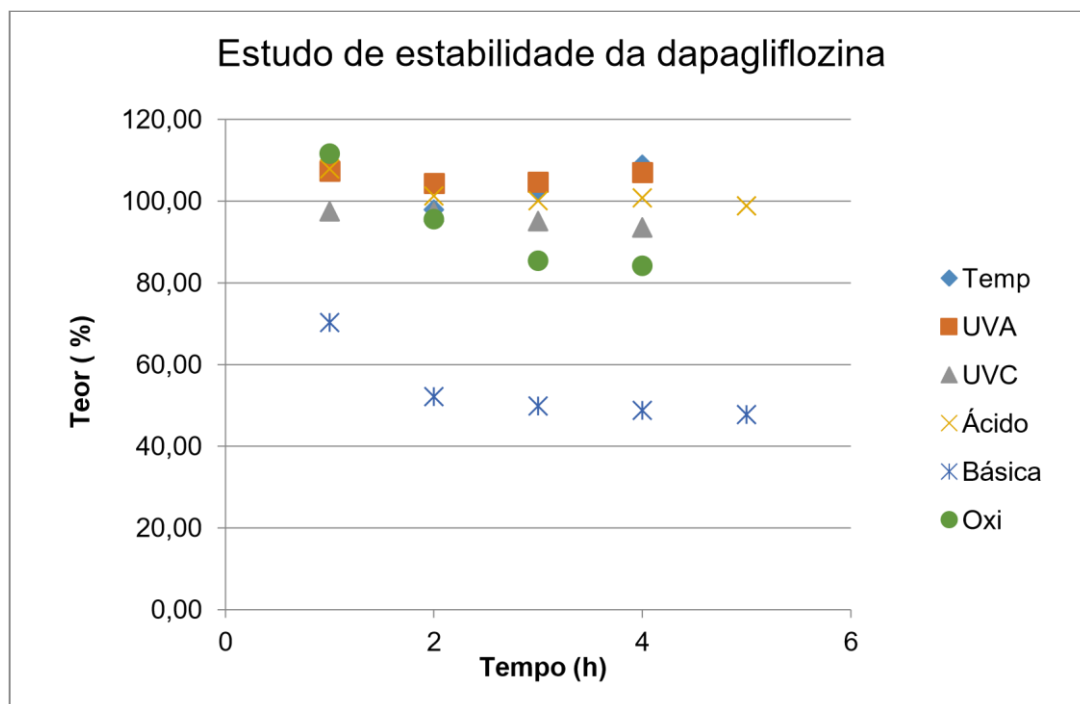


Figura 9. Gráfico representativo do decaimento no teor da dapagliflozina sob diferentes condições de degradação forçada.

#### 4.4.3.2 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação do método, obtidos através dos dados da curva padrão, foram de 6,2 e 18,8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Os valores encontrados estão de acordo com o esperado para a técnica, uma vez que a EC é um sistema analítico que apresenta uma menor detectabilidade, principalmente quando se empregam detectores de absorção no UV-Vis. Essa baixa detectabilidade é causada, em parte, pela reduzida quantidade de amostra injetada no capilar, na ordem de nanolitros. Outro fator que influencia na sua menor detectabilidade é o caminho óptico na região onde acontece a detecção, que é da ordem de 50 a 100  $\mu\text{m}$ , aproximadamente 100 vezes menor que nas celas de detecção usadas em equipamentos convencionais de CLAE (BONATO, 2010).

#### 4.4.3.3 Linearidade

A representação da curva padrão, obtida por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, encontra-se na Figura 10.

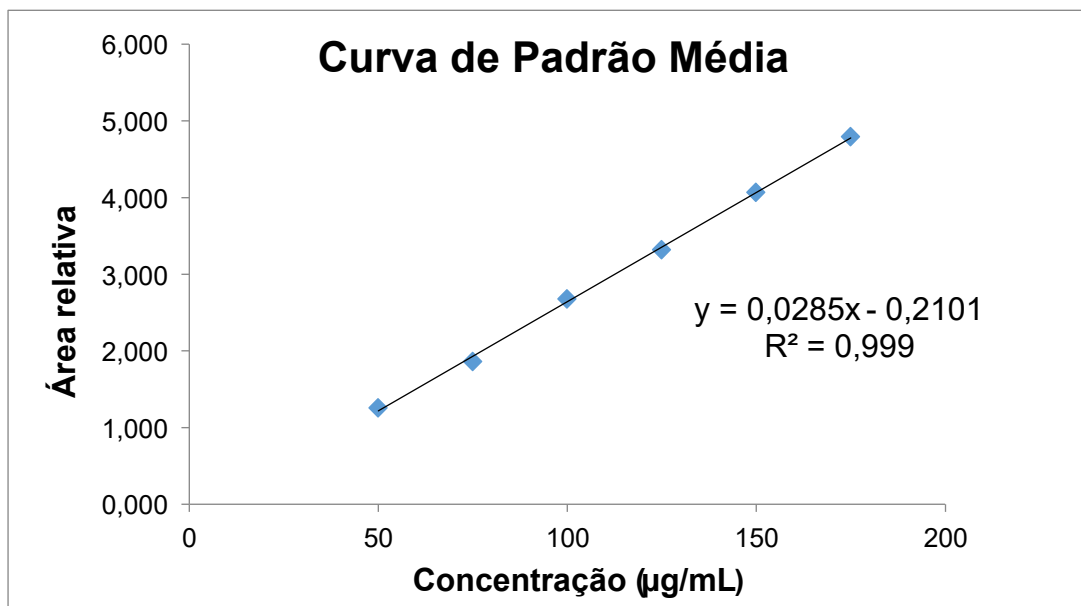


Figura 10. Representação gráfica da curva padrão da dapagliflozina obtida pelo método de eletroforese capilar.

A Tabela 19 apresenta os resultados correspondentes à análise de regressão linear dos dados determinados a partir da curva padrão média da dapagliflozina.

Tabela 19. Estatística de regressão linear da dapagliflozina.

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999512319
R-Quadrado	0,999024875
R-quadrado ajustado	0,998781094
Erro padrão	0,046570581
Observações	6

ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	8,887903557	8,887904	4098,0383	3,56692E-07
Resíduo	4	0,008675276	0,002169		
Total	5	8,896578833			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor-P</i>	<i>95% inferiores</i>	<i>95% superiores</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interseção	-0,21012381	0,053582677	-3,92149	0,0172261	-0,358893172	-0,061354447	0,358893172	0,061354447
Variável X 1	0,028506286	0,0004453	64,01592	3,567E-07	0,027269935	0,029742637	0,027269935	0,029742637

A Tabela 20 apresenta os dados para o cálculo do resíduo padronizado de regressão linear, realizado sobre os resultados obtidos na linearidade.

Tabela 20. Resíduos da regressão linear obtidos a partir dos resultados da linearidade da dapagliflozina.

<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Resíduos</i>	<i>Resíduos padrão</i>
1	1,215190476	0,041809524	1,003733845
2	1,927847619	-0,063847619	-1,532809042
3	2,640504762	0,037495238	0,900159487
4	3,353161905	-0,034161905	-0,820135148
5	4,065819048	0,002180952	0,052358781
6	4,77847619	0,01652381	0,396692078

A Figura 11 representa a distribuição dos resíduos obtidos a partir da curva de regressão linear da dapagliflozina.

A equação que descreve os resultados é  $y = 0,0285x - 0,2101$ , com um coeficiente de determinação ( $r^2$ ) igual a 0,999, o que demonstra a relação linear observada entre as concentrações da dapagliflozina e as respostas geradas.

A análise dos resíduos demonstra que estes apresentam distribuição normal, o que permite afirmar que não há tendência nos mesmos, sendo aleatoriamente distribuídos com ausência de amostras atípicas. Os resíduos padronizados também são adequados, uma vez que estão todos contidos no intervalo entre +2 e -2.



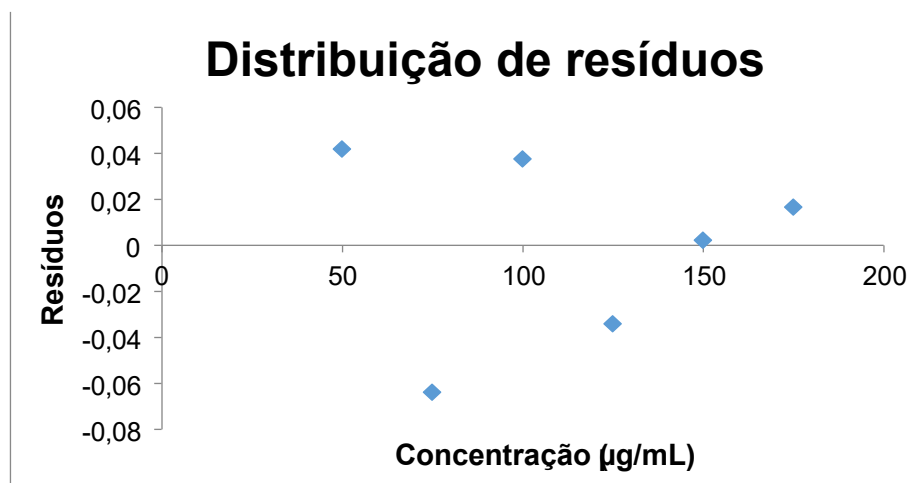


Figura 11. Representação gráfica da distribuição residual de regressão linear da dapagliflozina.

Os resultados do teste da ANOVA para a regressão linear foram considerados satisfatórios, podendo-se afirmar que o método proposto possui linearidade na faixa de concentração estudada (50 – 175 µg/mL).

#### 4.4.3.4 Precisão

A Tabela 21 apresenta os resultados do estudo da precisão do método, onde se verifica a baixa variabilidade obtida entre os resultados de um mesmo dia de análise (repetibilidade), bem como entre dias diferentes (precisão intermediária).

Os valores de DPR obtidos a partir dos resultados das análises das amostras de dapagliflozina intradia e interdia foram considerados satisfatórios para o método de eletroforese capilar proposto, demonstrando a precisão do mesmo.

**Tabela 21.** Resultados obtidos nos testes de repetibilidade e precisão intermediária.

<b>REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMEDIÁRIA</b>			
	<b>DIA 1 (µg/mL)</b>	<b>DIA 2 (µg/mL)</b>	<b>DIA 3 (µg/mL)</b>
	<b>INTERDIAS</b>		
AMOSTRA 1	98,41	95,58	99,10
AMOSTRA 2	100,67	95,52	99,82

AMOSTRA 3	95,89	94,74	92,85	
AMOSTRA 4	94,65	99,22	93,43	
AMOSTRA 5	99,87	97,58	97,08	
AMOSTRA 6	100,25	99,35	98,34	
<b>MÉDIA</b>	98,29	97,00	96,77	97,35
<b>DPR %</b>	2,53	2,06	3,05	2,52

#### 4.4.3.5 Exatidão

Os resultados da exatidão do método, verificada pelo teste de recuperação, estão apresentados na Tabela 22.

Tabela 22. Percentuais de recuperação da dapagliflozina em três níveis de concentração.

TESTE DE RECUPERAÇÃO				
	Concentração de Padrão Adicionado* (µg/mL)	Concentração Teórica Final (µg/mL)	Percentual de Recuperação da Dapagliflozina (%)	Recuperação Média   DPR (%)
R1	25,00	125,00	101,12	
	25,00	125,00	102,70	102,32   1,04
	25,00	125,00	103,15	
R2	50,00	150,00	100,92	
	50,00	150,00	101,69	101,22   0,40
	50,00	150,00	101,07	

	75,00	175,00	103,41	
R3	75,00	175,00	105,94	104,63   1,21
	75,00	175,00	104,52	

\*a solução amostra de dapagliflozina foi mantida a uma concentração constante de 100 µg/mL nos três níveis. O PI também foi adicionado em todas as soluções na concentração de 75 µg/mL.

Os percentuais de recuperação da dapagliflozina nas amostras analisadas em três níveis de concentração, baixo, médio e alto, encontram-se dentro dos limites aceitáveis para o método proposto. A média da recuperação do teste foi de 102,72%, o que atesta que o método é exato nas suas medições.

#### 4.4.3.6 Robustez

A Tabela 23 apresenta os resultados encontrados no estudo da robustez. As modificações realizadas nas condições definidas do método (variação na temperatura, tempo de injeção e voltagem aplicada) não comprometeram o resultado da análise da dapagliflozina. Os valores das áreas relativas (área amostra/ área PI) mantiveram-se muito próximos dos encontrados nas condições normais.

Tabela 23. Resultados das respostas analíticas da dapagliflozina em função das modificações nos parâmetros do método.

Parâmetro	Resposta média (área relativa)	DRP médio (%)
Temperatura 23 °C	1,331	1,11
Temperatura 27 °C	1,336	1,55
Tempo de injeção 4 segundos	1,328	2,88
Tempo de injeção 6 segundos	1,378	1,93

Voltagem aplicada 13,5 kV	1,399	0,64
Voltagem aplicada 14,5 kV	1,406	0,26
Condições normais	1,320	0,01

#### 4.4.4 Conclusão

O método por eletroforese capilar apresentou resultados satisfatórios para os parâmetros testados na validação analítica: especificidade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão e robustez. Assim sendo, pode-se considerar o método proposto adequado para a determinação da dapagliflozina em comprimidos.

#### **4.5 Paralelo comparativo entre os métodos por CLAE e EC para a determinação da dapagliflozina em comprimidos**

Após a conclusão da validação analítica dos dois métodos desenvolvidos para a determinação de dapagliflozina em comprimidos, foi realizada uma breve comparação estatística e teórica entre ambos.

Primeiramente, verificou-se a existência de diferença ou semelhança entre os resultados da determinação de dapagliflozina nas amostras de comprimidos pelo método de EC em comparação com o método cromatográfico. Para isso, foi empregado o teste t- student de comparação de médias utilizando os resultados do teste de repetibilidade de cada um dos métodos (Tabela 24).

A análise dos dados estatísticos permite assumir que não há diferença significativa entre os resultados obtidos pelos dois métodos quando empregados na determinação da dapagliflozina ( $p > 0,05$ ).

Além disso, também foi conduzida uma comparação empírica entre os métodos, traçando um paralelo entre os seus resultados e o impacto na rotina laboratorial em termos de custos e tempo de análise.

Quando se desenvolve um método analítico para aplicação no controle de qualidade farmacêutico, é imprescindível considerar não somente o resultado final, mas também o processo todo da análise. Metodologias que exigem preparos de amostra muito complexos, ou fazem uso de materiais muito

dispendiosos, por exemplo, podem se tornar menos vantajosos para incorporação na rotina de um laboratório.

Tabela 24. Comparação, pelo teste-t, das determinações dos comprimidos de dapagliflozina pelas técnicas de CLAE e EC.

	CLAE	EC
Média	96,73943306	97,44333333
Variância	0,546476894	5,705647059
Observações	18	18
Hipótese da diferença de média	0	
Gl	20	
	-	
Stat t	1,194355446	
P(T<=t) uni-caudal	0,123156049	
t crítico uni-caudal	1,724718218	
P(T<=t) bi-caudal	0,246312098	
t crítico bi-caudal	2,085963441	

Tanto a cromatografia líquida de alta eficiência quanto a eletroforese capilar são técnicas que apresentam vantagens e desvantagens, de acordo com seu uso pretendido.

A CLAE é uma técnica bastante consolidada nas análises farmacêuticas, e que possui como principais vantagens a capacidade em realizar separações e análises quantitativas de uma grande variedade de compostos presentes em diversos tipos de amostras, em escala de tempo reduzidos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (JARDIM, COLLINS e GUIMARÃES, 2006). Por outro lado, pode se tornar onerosa ao fazer uso de grandes quantidades de solventes orgânicos. Além disso, o impacto ambiental resultante da extensa geração de resíduos tóxicos a torna uma técnica pouco sustentável (PŁOTKA et al., 2013; FUNARI et al., 2014).

A EC, por sua vez, vem de encontro a essas desvantagens da cromatografia líquida, sendo considerada uma técnica muito mais “limpa”. Embora os métodos de EC possam ser desenvolvidos com soluções de

eletrólitos não aquosos, o uso de soluções aquosas é muito mais frequente, o que favorece a baixa produção de resíduos químicos. Devido às dimensões dos tubos capilares e o sistema de injeção, é possível obter separações de alta eficiência com pequenas quantidades de amostra e solventes, sendo considerada uma técnica simples e de baixo custo (BONATO, 2010). Em contrapartida, métodos por EC são menos sensíveis na detecção dos analitos quando comparados à cromatografia líquida (ALTRIA, 2005; AHUJA, 2007).

#### **4.6 Conclusão**

Ao final deste capítulo pode-se concluir que tanto o método por EC quanto por CLAE, desenvolvidos para a determinação quantitativa de dapagliflozina em comprimidos, mostraram-se adequados para o uso pretendido. Ambos atenderam aos requisitos pré-estabelecidos para os parâmetros de validação conforme os guias nacionais e internacionais, podendo ser inseridos na rotina dos laboratórios de controle de qualidade farmacêutico.

Os métodos assemelham-se na precisão de seus resultados, conforme verificado por análise estatística de comparação de métodos, mas apresentam diferenças no que se trata, principalmente, do tempo de análise, consumo de solventes e custos. O método por CLAE apresentou maior eficiência com relação ao tempo de análise, em torno de 3 vezes menor do que na EC, além de um menor tempo gasto no preparo da amostra e da fase móvel devido a simplicidade alcançada no seu desenvolvimento. No entanto, o gasto com solvente (acetonitrila) e a elevada geração de resíduos configura uma desvantagem desta técnica.

Por outro lado, o método desenvolvido por EC, apesar de mais extenso devido aos preparos de amostra e eletrólito, bem como em relação ao tempo de análise, é claramente mais econômico e ecologicamente mais sustentável, por fazer uso de quantidades muito pequenas de amostras e solventes, além da reduzida geração de resíduos (Tabela 25).

Tabela 25. Comparação entre os métodos de EC e CLAE na quantificação de dapagliflozina em comprimidos.

<b>Parâmetro</b>	<b>CLAE</b>	<b>EC</b>
Tempo de análise	4 minutos	8 minutos + 7,5 minutos de pré-condicionamento.
Preparo da fase móvel/ eletrólito	Misturar acetonitrila e água; sonicar; filtrar.	Pesagem do tetraborato de sódio; diluição em água; ajuste de pH; filtração.
Preparo do PI	-----	Pesagem do padrão; dissolução em água.
Preparo da amostra	Dissolver em ACN; diluir na fase móvel.	Dissolver em ACN; diluir no eletrólito.
Natureza dos solventes	Orgânico (65%) e aquoso (35%).	Aquoso.
Gasto de solventes por corrida	4 mL (2,6 mL de acetonitrila)	Insignificante (na escala de nanolitros).
Gasto de solventes na validação do método*	0,5 L de acetonitrila	Insignificante (na escala de nanolitros)

\*cálculo aproximado, usando apenas os gastos com a corrida analítica, sem contar os estudos de degradação forçada e as limpezas realizadas na coluna ao final de cada dia de trabalho.





---

**5      CAPÍTULO II. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO  
ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DE  
DAPAGLIFLOZINA E AVALIAÇÃO DO SEU PERFIL TOXICOLÓGICO**

---

## **5 CAPÍTULO II. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE IMPUREZAS ORGÂNICAS DE DAPAGLIFLOZINA E AVALIAÇÃO DO SEU PERFIL TOXICOLÓGICO**

### **5.1 INTRODUÇÃO**

De acordo com Krstulovic e Lee (1997), o processo de síntese de uma substância ativa dificilmente atinge um grau de pureza absoluta. As substâncias farmacêuticas, inevitavelmente, contêm algum tipo de impureza, em maior ou menor magnitude, e o papel das indústrias farmacêuticas é definir um perfil de impurezas aceitável de acordo com o uso pretendido de cada medicamento, sem comprometer sua segurança e eficácia terapêutica (KRSTULOVIC; LEE, 1997).

As principais entidades químicas encontradas como contaminantes, tanto nos IFAs quanto no produto acabado, são moléculas orgânicas oriundas do processo de síntese do fármaco ou decorrente de algum tipo de degradação. Por menor que seja a quantidade dessas substâncias presentes no medicamento, normalmente a níveis de traços, estas podem afetar diretamente a eficácia e a segurança do mesmo.

É fundamental que os fabricantes monitorem constantemente a presença dessas substâncias relacionadas nos seus produtos de acordo com os limites pré-definidos para sua quantificação, identificação e qualificação. Desta forma, a busca por métodos analíticos voltados para este fim tem sido um dos desafios para o controle de qualidade farmacêutico (HOLM; ELDER, 2016).

Dentre todas as ferramentas analíticas disponíveis, as técnicas cromatográficas vêm sendo amplamente empregadas para a determinação do perfil de impurezas nos produtos farmacêuticos. Sem dúvida, os métodos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) correspondem ao maior número de publicações relacionadas a este tema. Contudo, desde 2004 este cenário vem mudando, a partir da introdução da cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE) (RAO; NAGARAJU, 2003).

A CLUE possui fundamento de separação similar à CLAE, mas opera com pressões muito mais elevadas. Devido ao menor tamanho das partículas, a eficiência é muito maior. Além disso, a sensibilidade da detecção pode ser de

duas a três vezes maior do que por CLAE, dependendo da técnica de detecção utilizada. Outra importante vantagem da cromatografia líquida de ultraeficiência é sua capacidade de realizar separações com alta resolução entre os analitos em um reduzido tempo de análise (SWARTZ, 2007).

A segurança de uma formulação farmacêutica é garantida não somente pela qualidade do ingrediente farmacologicamente ativo, mas também pela ausência de efeito tóxico das suas impurezas e/ou produtos de degradação (WINGERT et al., 2018). As impurezas presentes em um medicamento, mesmo que em pequenas quantidades, podem representar potenciais riscos, e, portanto, devem ser avaliadas quanto ao seu potencial toxicológico de modo a garantir a segurança do paciente que fará uso do medicamento.

Conforme preconizado pelas agências reguladoras, os fabricantes de fármacos e medicamentos devem identificar, quantificar e qualificar as reais ou potenciais impurezas nas suas matérias-primas e produtos acabados. A qualificação é o processo de adquirir e avaliar dados que estabeleçam a segurança biológica de uma impureza nos níveis especificados (ICH Q3A(R2), 2006; BRASIL, 2015). Os ensaios de toxicidade *in vitro* são fundamentais para o estabelecimento do perfil toxicológico e avaliação da segurança de um produto farmacêutico, além de uma importante ferramenta para prever o comportamento tóxico de um composto.

Os efeitos citotóxicos de uma substância química podem ser avaliados por diferentes técnicas interdependentes. Além disso, a avaliação do potencial genotóxico de tais compostos contribui para a avaliação da segurança farmacológica, uma vez que as impurezas com potencial genotóxico induzem mutações, quebras de cromossomos e/ou rearranjos que podem levar ao desenvolvimento de câncer (GIORDANI; KOBEL; ULRICH, 2011). O guia do M7 do ICH orienta que, caso tenha sido identificado um risco potencial, é necessário um rigoroso controle durante o processo e também o desenvolvimento de metodologias analíticas para garantir os níveis aceitáveis (ICH M7, 2014).

As análises foram realizadas junto ao laboratório de avaliações toxicológicas da Faculdade de Farmácia – UFRGS, e seguiram as diretrizes da OECD (Organization for Economic co-Operation and Development) (OECD, 2010).

Neste capítulo, o objetivo do estudo foi desenvolver e validar um método por CLUE para identificar, separar e quantificar, simultaneamente, a dapagliflozina e suas potenciais impurezas relacionadas, de modo que possa ser facilmente incorporado na rotina dos laboratórios de controle de qualidade farmacêutico.

## 5.2 ARTIGO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

### SIMULTANEOUS ANALYSIS OF DAPAGLIFLOZIN AND ITS THREE RELATED IMPURITIES BY STABILITY-INDICATING UPLC METHOD AND IN VITRO TOXICITY EVALUATION

#### ABSTRACT

A new stability- indicating analytical method by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) was developed for the simultaneous determination of dapagliflozin and three of its synthesis impurities. A Waters® Acquity UPLC H- Class model was used for method development and validation. The separation was achieved in a Zorbax phenyl column (50 x 3.0 mm, 1.8 µm), using a mixture of acetonitrile: water (70:30, v/v) as mobile phase in isocratic mode. All the peaks were well detected by a photodiode array detector (PDA) at 230 nm. The method was properly validated according ICH guidelines with respect to linearity, specificity, precision, accuracy and robustness. Dapagliflozin samples tablets were submitted to forced degradation conditions in order to confirm the specificity of the method. The calibration curves of each analyte showed determination coefficients ( $r^2$ ) > 0.99 and the method was linear at the concentrations range 30-70 µg/mL for dapagliflozin and 1-10 µg/mL for the impurities. Lastly, this UPLC method presented low limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) for both dapagliflozin and impurities, being a technique with high sensitivity. The toxicity evaluation of dapagliflozina and its related impurities were evaluated using 3T3 cells. MTT reduction and neutral red uptake assays were performed in cytotoxicity tests. In addition, mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_M$ ), measurement of intracellular reactive oxygen and DNA damage (measured by comet assay) were evaluated. The impurity 3 showed significant damage in citotoxicity tests at a concentration of 0.5 µM, being even more expressive at higher concentrations. On the other hand, under the conditions tested, DNA damage was not detected and the compounds tested do not induce significant cell death.

**Keywords:** dapagliflozin, UPLC, validation, drug impurities, toxicity assay

## Highlights

- An UPLC method developed and validated for simultaneous determination of dapagliflozin and three synthesis impurities;
- The presented method showed high sensibility for the detection and quantification of the drug and the impurities in tablets samples;
- This fast and simple method can be applied with reliability to the quality control routine for monitoring the dapagliflozin impurities.
- The dapagliflozina related impurity 3 showed potencial risk to the cell viability, but any of the compounds appear to be toxic at the level of cellular DNA.

## 1. Introduction

Dapagliflozin (Forxiga®), chemically defined as (1s)-1, 5-anhydro-1-C-[4-chloro-3-[(4-ethoxyphenyl) methyl] phenyl]-D-glucitol (Fig 1a), is a novel drug intended for the treatment of adult patients with type 2 diabetes mellitus. It belongs to a class of drugs called gliflozins, which reduces the blood glucose levels by inhibiting the sodium-glucose cotransporter 2 protein (SGLT2) in the kidneys, leading to a reduction in the glucose reabsorption and, hence, increasing urinary glucose excretion [1], [2], [3] and [4]. Forxiga® is produced by AstraZeneca as coated tablets containing 5 or 10mg of dapagliflozin and was approved in Europe and United States in 2012 and 2014, respectively.

To control the quality of a pharmaceutical product and ensure its safety is necessary to make use of appropriate analytical techniques according to each type of analysis. Methods that attend to their pretended uses are fundamental in the routine of the pharmaceutical industries.

One of the current trends in the quality control area is to investigate and monitor potential impurities in drug substances and products, once the presence of these compounds in the final product may affect both its efficacy and safety [5], [6] and [7]. These impurities may come from different sources, such as residual solvents, synthesis intermediates or degradation products, for example [8]. The organic impurities, as synthesis intermediates and degradation products, are the most commonly found in pharmaceutical products [9].

Literature data describes some chromatographic (HPLC) and spectroscopic (UV) methods for the quantification of dapagliflozin alone [10], [11] and [12] or

dapagliflozin with other anti diabetic agents in bulk and dosage forms [13], [14] and [15]. HPLC method has also been developed for the determination of dapagliflozin and its degradation products [11]. However, there are no published analytical methods for the simultaneous determination of dapagliflozin in the presence of its related impurities.

Impurity profile methods must be, essentially, fast, simple and highly sensitive. Ultra performance liquid chromatography (UPLC) meets this purpose, since this technique has advantages such as: rapid analysis time, lower solvent consumption and high efficiency and detectability, 2 to 3 times higher when compared to HPLC, for example [16].

In addition to identifying the presence of possible contaminants in raw materials and pharmaceutical products, it is also necessary to assess the toxicity of these impurities, in order to ensure patient safety throughout treatment. The cytotoxic effects of a chemical substance can be assessed by different interdependent techniques. Besides, the evaluation of the genotoxic potential of such compounds also contributes to the evaluation of pharmacological safety, since impurities with genotoxic potential induce mutations, chromosome breaks and rearrangements that can lead to the development of cancer. In the process of synthesizing dapagliflozin, these related substances are usual intermediates that can remain in the final product as contaminants, leading to a decrease in its quality [17], [18] and [19].

In our study, we aimed to quantify and qualify the dapagliflozin and three organic related impurities, to ensure that the presence of these undesirable compounds is not above the limits recommended by regulatory agencies and to evaluate their toxic potential, considering the chronic use of these drugs. For that, it was established a stability-indicating method by ultra performance liquid chromatography to simultaneously determine dapagliflozin in the presence of its potential related impurities (fig 1b, 1c and 1d). Also, forced degradation studies were conducted to evaluate the specificity of the proposed method. The method development focused on the simplicity of the chromatography conditions to ensure its reproducibility in the laboratory routine.

Drug and impurities toxicity were evaluated by cytotoxicity and genotoxicity assay, which indicate the potential of these compounds to cause cellular and DNA damage.

## 2. Material and methods

### 2.1. Chemicals

Dapagliflozin (98%), Impurity 1 (98.4%): (5-Bromo-2-chlorophenyl)(4-ethoxyphenyl)methanone) and Impurity 2 (98%): 4-bromo-1-chloro-2-(4-ethoxybenzyl)benzene) were purchased from Ontario Chemical (Canada), while Impurity 3 (98%): tert-butyl diphenylchlorosilane was purchased from Carbosynth (United Kingdom). Forxiga® (dapagliflozin 10 mg tablets, AstraZeneca, were obtained from local market. Acetonitrile and purified water, both of analytical grades were used for sample preparation and mobile phase constitution.

### 2.2. Apparatus description

A Waters® Acquity UPLC H-Class model, equipped with a quaternary pump, an auto sampler, compartment with thermostat and diode array detector was used for method development and validation. Empower™ chromatography software was used for data acquisition and results analysis. The chromatographic separation was achieved in isocratic mode.

### 2.3. Stock solution preparation

#### 2.3.1. Standard solution

Standard solutions of dapagliflozin and its impurities were individually prepared in acetonitrile, in a final concentration of 100 µg/mL each. Further dilution of the stock solutions were made with the diluent (acetonitrile: water 50:50, v/v).

#### 2.3.2. Sample solution

Twenty Forxiga® tablets were accurately weighed and finely powdered. A quantity equivalent to 10 mg of dapagliflozin was transferred to a 10 mL volumetric flask containing acetonitrile, which was kept in ultrasonic bath for 30 minutes, in order to extract the dapagliflozin from the dosage form. The volume was completed with the same solvent and the solution was filtered using paper.



This stock solution was diluted to 500 µg/mL and filtered with 0.22 µm membrane before injection.

### 2.3.3. *Placebo solution*

All the excipients contained on the dosage form (microcrystalline cellulose, anhydrous lactose, crospovidone, silica dioxide, magnesium stearate, polyvinyl alcohol, titanium dioxide, macrogol and talc), were weighed in their usual concentration according the Handbook of Pharmaceutical Excipients and prepared by the same way of sample solution.

## 2.4. Method validation

The analytical method was validated according to the Official Guides, which establish the evaluation of the following parameters: specificity, linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ), precision, accuracy and robustness [20], [21] and [22].

### 2.4.1. *Specificity*

The specificity of the method was evaluated by the injection of the placebo solution at a theoretical concentration of 100 µg/mL and the chromatogram was compared with the standard solutions. Besides, forced degradation of the sample solution was carried out under the following conditions: for acid, alkali and oxidative degradations, aliquots of 5 mL of the sample solution were transferred to 20 mL volumetric flasks with 5 mL of HCl 1M, NaOH 1M or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, and the final volume completed with the mobile phase. Photolytic studies were done by exposing aliquots of the sample solution to mirror chambers (100 x 18 x 17 cm) equipped with UVA (352 nm) and UVC (254 nm) lamps. For thermal degradation, the sample was kept under 60 °C in the oven. Every one hour, for five hours, an aliquot of each solution, in all stress conditions, was diluted with mobile phase and injected in the chromatographic system in a concentration of 100 µg/mL. All the solutions were filtered using 0.22 µm membrane filters before UPLC analysis.

### 2.4.2. *Linearity*

The linearity of the method was checked by the injection of the analytes in a range corresponding to their individual calibration curves, in three different days. The impurities calibration curves were prepared at seven points (1.0 to

10.0 µg/mL), while the dapagliflozin curve was made with five points (30.0 to 70.0 µg/mL). All the points were injected in triplicate and the media of the values were used in the statistic analysis by linear regression.

#### 2.4.3. LOD and LOQ

Limits of detection and quantification of dapagliflozin and its impurities were obtained from linearity data, based on the standard deviation of the response ( $\sigma$ ) and the slope (S), and was calculated using the formulas:  $LOD = 3.3 \sigma / S$  and  $LOQ = 10 \sigma / S$ . □

#### 2.4.4. Precision

Precision of the method was assured considering intraday (repeatability) and inter-day (intermediate precision) analysis. For this assay, six individual sample solutions were prepared as mentioned at item 2.3.2., in a final concentration of 50 µg/mL, which corresponds to the test concentration. After this, each of these solutions was spiked with 5 µg/mL of the impurities standard solutions. All the individual spiked solutions were injected in triplicate, and the same procedure was performed on three successive days. RSD values of areas were evaluated.

#### 2.4.5. Accuracy

Known amounts of the impurities and dapagliflozin standards were spiked in the sample solution that was kept in a fixed concentration of 50 µg/mL. The impurities and dapagliflozin standard concentrations were modified at three levels, corresponding to 1, 5 and 10 µg/mL and 30, 50 and 70 µg/mL, respectively. Each solution was prepared in triplicate and the values are expressed as percentage of the mean experimental concentration by the theoretical concentration.

#### 2.4.6. Robustness

The verification of robustness was carried out during the development of the method, in order to evaluate if characteristics chromatography parameters as resolution, theoretical plates and symmetry of peaks, do not be compromised in front of minimal variations in analytical conditions. The main modifications were with respect to the mobile phase proportion, flow rate and injection volume.

## 2.5 Cell culture

Cell viability assays were performed using mouse fibroblast type 3T3 cell line. The cells were cultured in DMEM culture medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% fetal bovine serum. For the control of microbiological contamination in cell culture, 100 U/mL of penicillin and 100 mg/mL of streptomycin were added. The 75 cm<sup>2</sup> culture flasks were placed in a CO<sub>2</sub> oven (atmosphere: CO<sub>2</sub> 5% and O<sub>2</sub> 95%). Upon reaching 70 to 80% confluence, the cells were subcultured to allow their continuous multiplication.

## 2.6 Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was assessed using MTT reduction and Neutral Red (NR) uptake assays. Cells were seeded in 96-well plates containing 10,000 cells per well. The samples of dapagliflozin and its impurities were prepared in DMSO, and tested at concentrations of 0.1; 0.25; 0.5; 1.0; 10.0 and 50.0 µM. As negative controls, culture medium and DMSO were used, and triton X-100 as a positive control.

### 2.6.1 MTT reduction assay

To determine cell viability by the MTT assay, 100 µL aliquots of the cell culture suspension containing the culture medium were incubated for 24 hours at 37°C. Subsequently, the supernatant containing the culture medium was removed, and each treatment was added, separately (drug and impurities), in different concentrations in the wells of the culture plates, which were kept incubated again at 37 °C for 24 or 96 hours.

After this period, the samples were removed from the wells and washed with sterile phosphate buffered saline (PBS). Then, the 0.5 µg / mL MTT solution was added to the wells containing the post-treatment cells and the plates incubated for 24 hours. Afterwards, the MTT solution was removed and the DMSO added to solubilize the formazan crystals. The plates were shaken for 5 minutes, protected with aluminum foil and put to rest for another 5 minutes.

The absorbances were read in a plate reader at 550 nm. To reduce interexperimental variability, data were normalized and scaled between 0% (negative control) and 100% effect (positive control). The experiments were carried out in triplicate and each concentration was tested with three replications.

### *2.6.2 Neutral red uptake assay*

The assay was performed as previously described in 2.6.1 item. After 24 or 96 hours of incubation of the cells with drug or impurities, the medium was removed, washed with phosphate buffer and replaced with a 50  $\mu\text{M}$  neutral red solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), which was kept for a period of 3 hours at 37 °C. Two washes were made with sterile PBS solution, followed by a wash with 1%  $\text{CaCl}_2$  in 0.5% formaldehyde. Then, the cells were lysed with ethanol/ glacial acetic acid 50:1 (v/v), with agitation for 10 minutes followed by 5 minutes of rest. The absorbance was measured at 540 nm and the percentage of cell death in relation to the control cells was used as a measure of cytotoxicity.

### *2.6.3 Measurement of intracellular reactive oxygen*

The intracellular reactive oxygen (ROS) species production was monitored by means of the DCFH-DA assay. For this determination, the cells were seeded at a density of 10,000 cells per well in 96 well plates and allowed to grow for 24 h. On the day of the experiment, the cells were pre-incubated with 10  $\mu\text{M}$  of DCFH-DA for 30 min at 37 °C in the dark. The cells were rinsed with PBS and incubated with the drugs and their impurities at 0.10; 0.25; 0.50; 1.0; 10.0 e 50.0  $\mu\text{M}$  for 24 or 96 h. Tert-butyl hydroperoxide (500  $\mu\text{M}$ ) was used as a positive control. Fluorescence was recorded in a fluorescence microplate reader (SpectraMax M2e, SoftMax® Pro 5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) set at 485 nm excitation and 530 nm emission. The data obtained were calculated as the percentage of control conditions for each experiment from at least three independent experiments with each concentration tested in three replicates within each experiment.

### *2.6.4 Assessment of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ )*

The mitochondrial integrity was evaluated by measuring tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate (TMRE) inclusion. To perform this assay, cells were seeded at a density of 10,000 cells per well. After 24 h of incubation at 37 °C, the medium was gently aspirated and the cells were incubated with the drugs and their impurities at 0.10; 0.25; 0.50; 1.0; 10.0 e 50.0  $\mu\text{M}$  for 24 or 96 h. Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCPC) 100  $\mu\text{M}$  was used as positive control. Then, the medium was substituted by a new medium containing

2 $\mu$ M of TMRE for 30 min at 37 °C in the dark. Afterwards, the medium was gently aspirated and replaced by phosphate buffer. Fluorescence was measured in a fluorescence microplate reader set to 544 nm excitation and 590 nm emission. Three replicates were made in four independent experiments.

### 2.6.5 Comet assay

The cells were seeded for 24 hours at a density of 60.000 cells per well. After this time, the medium was aspirated and the cells were incubated with the analytes at 0.1; 1.0 and 10.0  $\mu$ M at 37 °C. After 24 h of incubation time, the cells were harvested by trypsinization (0.05% trypsin/ EDTA). The cell suspensions were centrifuged (400 $\times$ g, 5 min, 4 °C), the obtained cell pellets were resuspended in low-melting point agarose (0.75%, 150  $\mu$ L) (Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) and 60  $\mu$ L aliquots were distributed on two slides coated with 1% normal-melting agarose. The samples were incubated in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, distilled water, 10% DMSO, and 1% Triton X-100) at 4 °C for 24 h in the dark. The slides were then incubated with alkaline electrophoresis running buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13) for 20 min at 4 °C before electrophoresis, which was carried out for 20 min at 25 V and 300 mA. After that, the slides were neutralized with 0.4 M Tris-HCL for 15 min in the dark. The DNA was fixed by immersing the slides in 70% ethanol for 15 min and in absolute ethanol for a further 15 min and left to dry overnight. For the microscopy analysis, the dried slides were stained with gel red (20  $\mu$ g  $^{-1}$ ) and DNA migration was observed in at least 100 cells at 400x magnification using a fluorescence microscope (Olympus, Japan) equipped with a 510–550 nm excitation filter of connected to a camera. The images were evaluated by Open Comet™ software. The percentage of DNA in the comet tail (% DNA in tail) was the parameter evaluated to describe comet formation.

Concurrently with the comet assay, an extra and identical replicate comet slide was prepared, lysed, and immediately fixed and stained without electrophoresis for evaluation of the cytotoxicity using the low molecular weight (LMW) DNA diffusion assay.

## 4. Results and Discussion

### 4.1. UPLC method development

During the development of a chromatography method for the simultaneous analysis of two or more compounds, it is necessary to attend, at least, two main criteria: adequate resolution between the analytes, as well as reduced total run time – especially if the proposed method intends to be applied in the quality control routine. However, when it comes to a technique for the quantification of the drug and its related impurities, another challenge is to achieve a method with high sensitivity, able to detect the presence of these impurities at trace levels. Based on this, the initial point in the method development was to test the chromatography conditions in which all the analytes are detected without coelution and with a satisfactory retention time. The first step was to define the mobile phase composition and proportions. Since the solvent used to dissolve the dapagliflozin and the impurities standards was the acetonitrile, it was chosen to test it as a component of the mobile phase. In addition, one of the goals in optimizing the chromatography method was to keep its simplicity, avoiding the use of buffers or organic modifiers, while it is possible. Therefore, after many tests, a mixture of acetonitrile and water (70:30, v/v) was chosen as the mobile phase composition. Likewise, tests with different stationary phases were conducted starting from the most usual, as C18, C8 columns, and also a more polar column as the cyano. However, any of these had satisfactory results, especially with respect to the extensive retention time of the analytes. After several trials, the column that presented the best performance, both in retention time and resolution between the peaks, was a Zorbax phenyl column (50 x 3.0 mm, 1.8  $\mu$ m). Modifications in the flow rate and injection volume were also verified in order to achieve better results in the most important chromatographic parameters for the analysis of drugs and related substances. The flow rate was fixed in 0.1 mL/min, injection volume of 2  $\mu$ l, and the column temperature kept constant at 25 °C. The absorbance detection wavelength was 230 nm, in which all the analytes of interest showed satisfactory absorption, in a fast analysis time of 8 minutes (Figure 2). To verify the application of the method in coated tables of dapagliflozin, a sample solution, prepared as describe at 2.3.2 item, was

injected in the UPLC in a concentration of 500 µg/mL. The batch tested did not show the presence of any of its potential impurities.

## 4.2. Analytical validation

### 4.2.1. Specificity

The specificity of the developed method was proved by the absence of any significant interference from placebo on dapagliflozin determination. Besides, stability studies were carried in the dapagliflozin dosage form to confirm the degradation products eventually formed do not compromise the impurities analysis. Figure 3 shows representative chromatograms of dapagliflozin under acid, alkaline, oxidative and UVC degradations. As can be seen, any degradation product had the same retention time of the related impurities. After 5 hours at UVA light and 60°C exposing, was not observed any degradation, demonstrating the drug is stable under this condition.

### 4.4.2. Linearity

The linearity of the method was evaluated by linear regression analysis of each analyte separately and the results were all satisfactory (Table 1). The calibration curves of dapagliflozin, impurity 1, impurity 2 and impurity 3 showed determination coefficients ( $r^2$ )  $\geq 0.99$  and the residual analysis indicated absence of atypical samples.

### 4.2.3. LOD and LOQ

The limits of detection and quantification of the drug and its impurities were obtained through the linearity curves, by the standard deviation of the response ( $\sigma$ ) and the slope (S). The results founded for dapagliflozin were 1.7 µg/mL (LOD) and 5.7 µg/mL (LOQ), impurity 1 were 0.08 µg/mL (LOD) and 0.25 µg/mL (LOQ), impurity 2 were 0.09 µg/mL (LOD) and 0.3 µg/mL (LOQ) and for impurity 3 were 0.26 µg/mL (LOD) and 0.8 (LOQ). These results were considered very satisfactory according to the ICH Guideline Q3A (R2), which establishes the notification, identification and qualification limits for impurities in drug substances. It is important that the LOQ is below the notification limit of the impurity in order to guarantee the sensibility of the method to the intended use.

#### 4.2.4. Precision

Table 2 presents the data of precision studies, obtained from the intra-day (repeatability) and inter-day (intermediate precision) results. The RSD values were calculated and all are  $\leq 3\%$ , which is considered adequate for analytical methods for quantitative determination of impurities.

#### 4.2.5. Accuracy

The accuracy of the method was assessed by spiking known amounts of the dapagliflozin and impurities standards in the drug samples in three different levels and injected in triplicate into chromatographic system. The results are reported in Table 3 as the percent recovery of each analyte in the sample. All the recovery values were considered satisfactory, with acceptable relative standard deviations  $\leq 3\%$ .

#### 4.2.6. Robustness

During the development of the method, some variations in the analytical conditions were made in order to assure the reliability of the analysis against minimal changes in chromatography system. The mobile phase composition, flow rate and volume of injection were deliberately modified and the analytical run was evaluated with respect to the chromatography parameters which could compromise the analysis results, as resolution between the peaks, symmetry, theoretical plates and areas values. After this study, it was possible to assure the method resists to these variations without compromising the separation, detection and quantification of the analytes.

### 4.3 Toxicity evaluation

#### 4.3.1 MTT reduction assay

The MTT assay (3 - [4,5-dimethyl-thiazol - 2-yl] - 2,5 - diphenyl-tetrazolium bromide) is based on the reduction of the MTT salt by the mitochondrial dehydrogenase enzyme to form formazan blue as a product . The test measures cell respiration, which is proportional to the amount of formazan produced and the number of viable cells in culture [23], [24]. The results are represented by the percentage of viable cells in relation to the control versus the six concentrations of each treatment.



The exposure of 3T3 cells to dapagliflozin did not show reduction in cell viability at any concentrations and incubation time evaluated, which suggests that the drug has no cytotoxic effect under these conditions. On the other hand, the results of its synthetic impurities indicate some toxicity for the cells. Impurities 1 and 3 showed a small reduction in cell viability only at the highest concentrations tested (1.0, 10.0 and 50.0  $\mu\text{M}$  / 96h). Impurity 3 showed very significant results of damage to cells since the concentration of 0.5  $\mu\text{M}$  in the acute exposure (24h) and even more in the chronic incubation time (96h), this damage being proportional to its concentration (Figure 4).

#### 4.3.2 *Neutral red uptake assay*

The neutral red test is based on the ability of viable cells to incorporate the supravital neutral red dye. In dead or damaged cells the dye cannot be retained [25].

The results found for both the drug and impurities were similar that of the MTT assay (Figure 5). Once again, dapagliflozin showed no reduction in cell viability, while its impurities demonstrated toxicity to cells at different magnitudes. In this assay, impurity 1 reduced cell viability significantly at concentrations of 10 and 50  $\mu\text{M}$ , while impurity 3 showed the highest toxicity from the 0.25 to 50.0  $\mu\text{M}$ .

#### 4.3.3 *Measurement of intracellular reactive species*

The excess of reactive species may lead to adverse effects, such as membrane peroxidation, loss of ions, protein cleavage, and DNA strand breakage [26]. The effect of the drug and its impurities on the generation of reactive oxygen and nitrogen species was evaluated by the DCFH-DA assay. This compound crosses cell membranes and it is enzymatically hydrolyzed by intracellular esterases in non-fluorescent dichlorodihydrofluorescein (DCFH) [27]. The cells exposure to the DCFH-DA induced an increase in the production of reactive oxygen and nitrogen species both in dapagliflozin and impurities samples. In the case of dapagliflozin, the formation of reactive species was observed only at 96 hours of incubation, in the concentrations of 1.0 and 10.0  $\mu\text{M}$  ( $p < 0.01$  and  $p < 0.001$ , respectively) (Figure 6). In the impurities samples, the results suggest that these compounds have a greater tendency to form reactive species, as shown in figure

6. At 96 hours of exposure, all impurities cause significant oxidative stress to 3T3 cells, suggesting that oxidative stress plays a role in its cytotoxicity.

#### *4.3.4 Assessment of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ )*

The  $\Delta\psi_m$  is the most important parameter controlling the accumulation of  $\text{Ca}^{2+}$  and ATP synthesis and its measurement is directly related to the normal cell function. Because of its crucial role in the maintenance of the physiological function of the respiratory chain generating ATP, changes in  $\Delta\psi_m$  compromise oxidative phosphorylation by reducing cell energy and inducing cell death [28]. Both depolarization or hyperpolarization of the mitochondrial membrane can be indicative of cell damage at different levels. As shown in figure 7, impurity 3 has a more pronounced effect on mitochondria compared to other analytes. As can be seen, the impurities caused an increase in  $\Delta\psi_m$ , which is indicative for mitochondrial hyperpolarization. This can stimulate the reverse proton flux through the respiratory chain and subsequent production of ROS and cell death.

#### *4.3.5 Comet assay*

The more useful approach for assessing DNA damage is the single-cell gel (SCG) or Comet assay. It is a simple method to measure the DNA strand breaks in eukaryotic cells and is widely used to assess the safety of drugs [29]. The electrophoretic comet is the normal comet assay, which indicates single or double breaks in the DNA strand; the comet without electrophoresis is also called low molecular weight DNA, and is related to the degradation of DNA resulting from cell death and not necessarily with genotoxic effects [30].

Although some impurities have some toxicity, none have been shown to cause DNA damage (Figure 8).

## **5. Conclusions**

The present method met all the requirements of the analytical validation protocol and can be used for the simultaneous analysis of dapagliflozin and its related impurities. This UPLC method demonstrated to be an adequate technique to the routine quality control analysis, once it is a simple, fast and sensitive method to quantify, with reliability, the presence of impurities in dapagliflozin tablets.

The qualification of the drug and its related impurities, performed by different toxicity assay, is important and mandatory, mainly in chronic use due to their daily accumulation. The present results showed that dapagliflozin did not cause any type of cellular or DNA damage in any of the tested concentrations. In contrast, its contaminants, especially Impurity 3, showed a drastic reduction in cell viability, suggesting a high cytotoxic potential for this substance. Since the dapagliflozin is used in the treatment of a chronic disease, these results contribute significantly to quality control throughout the entire production process. It is extremely important that manufacturers carefully monitor the synthesis processes of the active pharmaceutical ingredient, as well as the production stages of the final product, in order to ensure its safety and therapeutic effect.

### **Acknowledgments**

Authors are thankful to CAPES and CNPq (Brazil) for financial support.

### **References**

- [1] Madaan, T., Akhtar, M., Najmi, A. K. Sodium glucose CoTransporter 2 (SGLT2) inhibitors: Current status and future perspective. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 93, p. 244-252, 2016.
- [2] Vivian, E. M. Dapagliflozin: A new sodium–glucose cotransporter 2 inhibitor for treatment of type 2 diabetes. *American Journal of HealthSystem Pharmacy*, v. 72(5), p. 361-372.
- [3] Saeed, M. A., & Narendran, P. Dapagliflozin for the treatment of type 2 diabetes: a review of the literature. *Drug design, development and therapy*, v.8, p. 2493, 2014.
- [4] Jabbour, S. A.; Goldstein, B. J. Sodium glucose co-transporter 2 inhibitors: blocking renal tubular reabsorption of glucose to improve glycaemic control in patients with diabetes. *International journal of clinical practice*, v. 62, n. 8, p. 1279-1284, 2008.

- [5] Kaṭny, M., & Frankowski, M. Impurities in drug products and active pharmaceutical ingredients. *Critical reviews in analytical chemistry*, v. 47(3), p. 187- 193, 2017.
- [6] Patil, P. P., Kasture, V. S., & Prakash, K. V. Impurity profiling emerging trends in quality control of pharmaceuticals. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry IJPC*, v. 5(01), p. 1-10, 2015.
- [7] Ramachandra, B. Development of impurity profiling methods using modern analytical techniques. *Critical reviews in analytical chemistry*, v. 47(1), p.24- 36, 2017.
- [8] ICH – Internacional Conference on Harmonisation of technical requirements for registration on pharmaceuticals for human use: Impurities in new drug products - Q3B (R2), 2006.
- [9] Bueno, L. M., et al.. HPLC method for simultaneous analysis of ticagrelor and its organic impurities and identification of two major photodegradation products. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 97, p. 22-29, 2017.
- [10] Debata, J., Kumar, S., Jha, S. K., & Khan, A. A New RP-HPLC method development and validation of dapagliflozin in bulk and tablet dosage form. *Int J Drug Dev & Res*, v. 9(2), p. 48-51, 2017.
- [11] Sanagapati, M., Lakshmi, D. K., Reddy, N. G., & Sreenivasa, S. Development and Validation of stability-Indicating RP-HPLC method for determination of Dapagliflozin. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, v. 4(3), 2015.
- [12] Manasa, S., Dhanalakshmi, K., Nagarjuna, R., & Sreenivasa, S. Method development and validation of dapagliflozin in API by RP-HPLC and UV-spectroscopy. *International Journal of Pharmaceutical Science and Drug Research*, v. 6, p. 250-252, 2014.
- [13] Jani, B. R., Shah, K. V., & Kapupara, P. P. Development and Validation of UV Spectroscopic First Derivative Method for Simultaneous Estimation of

- Dapagliflozin and Metformin Hydrochloride in Synthetic Mixture. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, v. 1(1), p.102, 2015.
- [15] Yunoos, M., & Sankar, D. G. A validated stability indicating high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of metformin Hcl and dapagliflozin in bulk drug and tablet dosage form. *Asian Journal of Pharmaceutical Clinical Research*. V. 8(3), p. 320-326, 2015.
- [16] Khalil, G. A., Salama, I., Gomaa, M. S., & Helal, M. A. (2018). Validated rp-hplc method for simultaneous determination of canagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin and metformin. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, v. 8(1).
- [17] Maldaner, L.; jardim, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova*, v. 32, p. 214-222, 2009.
- [18] Meng, W. et al. Discovery of dapagliflozin: A potent, selective renal sodium-dependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, n. 5, p. 1145–1149, 2008.
- [19] Jayachandra, S. B.; Nagda, D. P.; Singh, T. K. (2016). Process for the Preparation of 4-bromo-1-chloro-2-(4-ethoxybenzyl)benzene. Available in: <<https://patents.google.com/patent/WO2015063726A1/en>>
- [20] Guoliang, L. et al.(2016). Preparation method of SGLT-2 inhibitor compound. Available in: <<https://patents.google.com/patent/CN105481915A/en>>
- [21] Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RE 166, de 24 de julho de 2017. Autoriza a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2017.
- [22] ICH. International Conference on Harmonization. Validation of Analytical Procedures: methodology. Q2B (R1) ICH Steering Committee, 2005.

- [23] USP 41 – The United States Pharmacopeia. 41 ed. Rockville: United States Pharmacopeia Convention, 2018.
- [24] FOTAKIS, G. TIMBRELL, J.A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, v. 160, p. 171-177, 2006.
- [25] Arbo, M.D., Altknecht L.F., Cattani, S., Braga, W.V., Peruzzi, C.P., Cestonaro, L.V., Göethel, G., Durán, N., Garcia, S.C. In vitro cardiotoxicity evaluation of graphene oxide. *Mutation Research*, v. 841, p. 8-13, 2019.
- [26] Giordani, C.F. A. et al. In vitro toxic evaluation of two gliptins and their main impurities of synthesis. *BMC Pharmacology and Toxicology*, v. 20, n. 1, p. 1- 9, 2019.
- [27] Onoue, S. et al. Reactive oxygen species assay-based risk assessment of drug-induced phototoxicity: classification criteria and application to drug candidates. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 47, p. 967-972, 2008.
- [28] Halliwell, B.; Whiteman, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. *British journal of pharmacology*, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.
- [29] Lemasters, J. J. et al. Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy. *Antioxidants & redox signaling*, v. 4(5), p. 769–781, 2002.
- [30] Vasquez M. Z. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. *Mutagenesis*, v. 25(2), p.187–199, 2010.

[31] Tice, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, v. 35(3), p. 206-221, 2000.

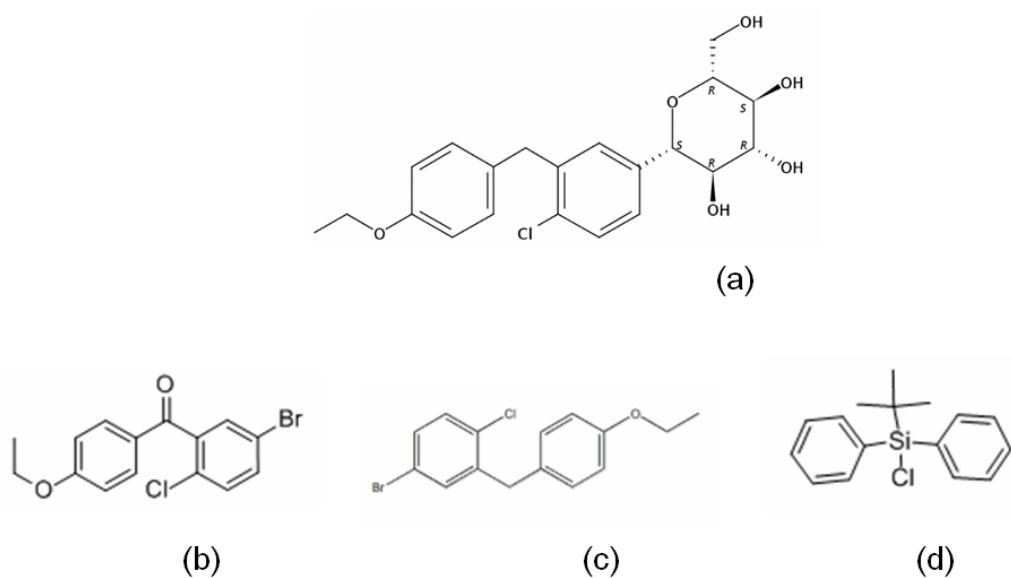


Fig.1 Chemical structures of Dapagliflozin (a), Impurity 1 (b), Impurity 2 (c) and Impurity 3 (c).

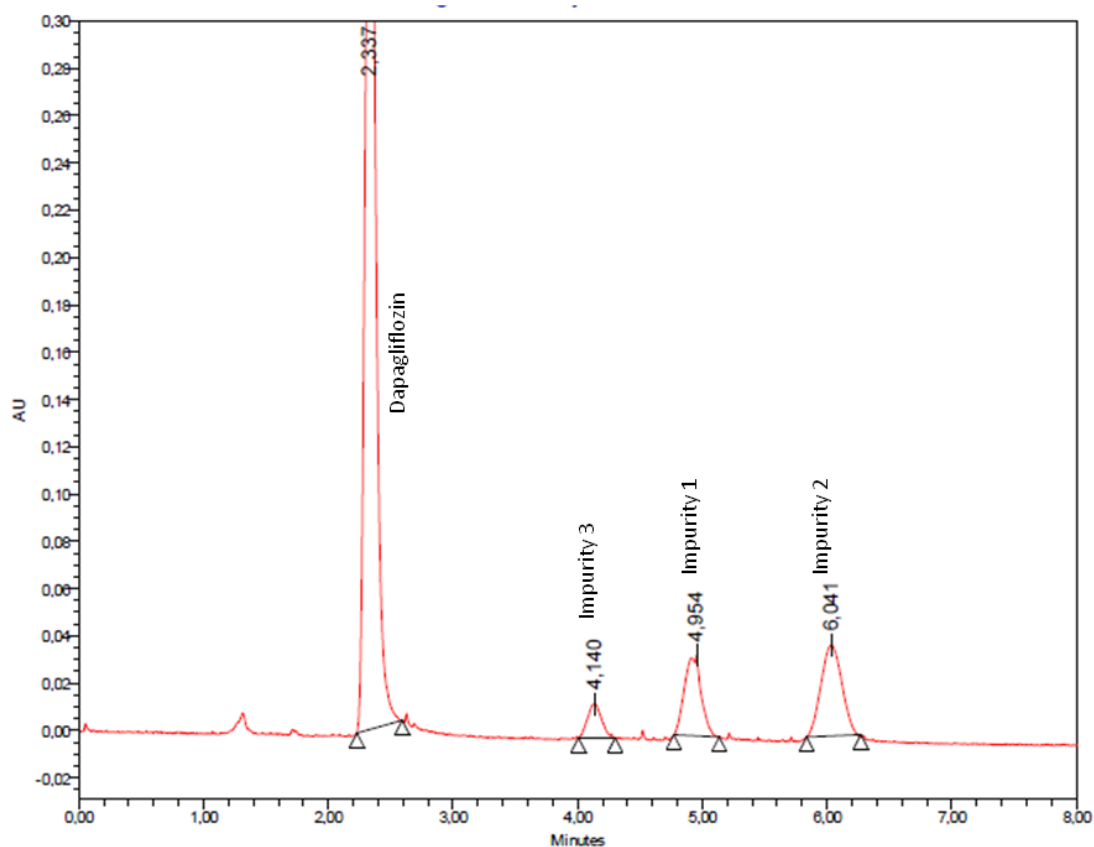


Fig. 2 Representative chromatogram of dapagliflozin and its synthesis impurities at 50.0 and 5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. Chromatographic conditions: Zorbax phenyl column (50 x 3.8 mm, 1.8  $\mu\text{m}$ ) at 25  $^{\circ}\text{C}$ , with a mobile phase consisting of acetonitrile: water (70:30 v/v), at a flow rate of 0.1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  and injection volume of 2  $\mu\text{L}$ . The detection was made at a wavelength of 230 nm by using PDA detector.



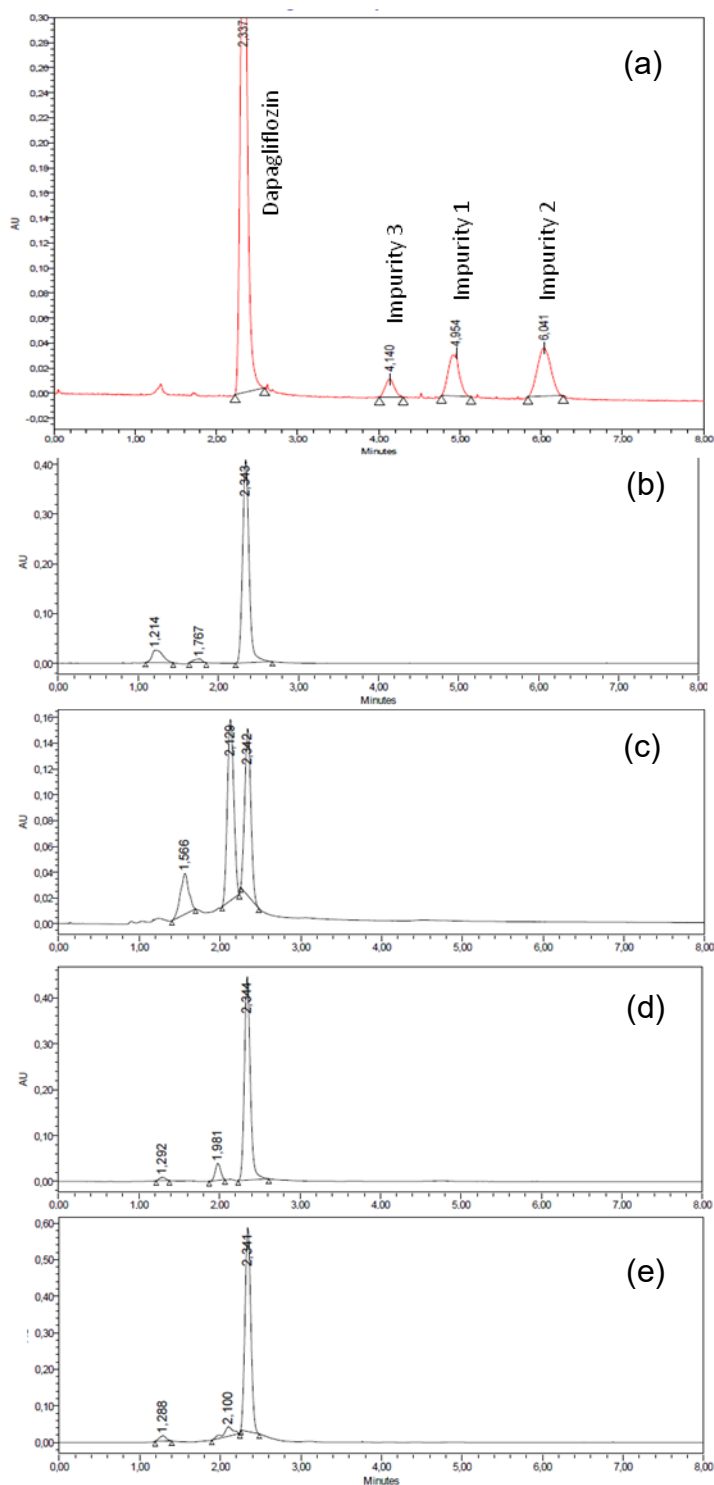


Fig. 3 Representative chromatograms of dapagliflozin under stress conditions: dapagliflozin non-degraded sample and synthesis impurities (a); acidic degradation (1M HCl, 5h) (b); alkaline degradation (1M NaOH, 5h) (c); oxidative degradation (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5h) (d) and UVC degradation, 5h (e).

Table 1 Statistical data for the linearity parameters of dapagliflozin, impurity 1, impurity 2 and impurity 3.

	Dapagliflozin	Impurity 1	Impurity 2	Impurity 3
Concentration range (µg/mL)	30.0 – 70.0	1.0 – 10.0	1.0 – 10.0	1.0 – 10.0
Regression equation	25518x + 8024.9	65899x – 2623.2	72182x-5601.4	24672x – 1684
Determination coefficient (r <sup>2</sup> )	0.9996	0.9999	0.9999	0.9992
F	8437,0133	65669,2385	41526,7498	6102,085424
Significance F	2,84448E-06	1,71723E-11	5,39973E-11	6,51397E-09
Lower 95%	-32514,7963	-6682,66793	-11193,2083	-6670,1864
Upper 95%	48565,39639	1436,460012	-9,62336033	3301,7573

Table 2 Intraday and inter-day precision results of dapagliflozin and impurities 1, 2 and 3.

Days	1	2	3	1	2	3	
<b>Dapagliflozin</b>				<b>Impurity 1</b>			
Repeatability (%)	95.05	95.62	94.19	Repeatability (%)	95.9	96.06	97.49
RSD %	1.32	0.49	2.67	RSD %	2.28	1.05	2.18
Intermediate Precision (%)	94.94			Intermediate Precision (%)	96.48		
RSD %	1.75			RSD %	1.96		
<b>Impurity 2</b>				<b>Impurity 3</b>			
Repeatability (%)	92.67	92.53	94.43	Repeatability (%)	95.46	98.24	100.37
RSD %	2.63	1.60	0.47	RSD %	2.02	1.70	0.36
Intermediate Precision (%)	93.21			Intermediate Precision (%)	98.02		
RSD %	1.93			RSD %	2.54		

Table 3 Recovery data at three levels (R) for dapagliflozin and its impurities.

	Theoretical concentration (µg/mL)	Experimental concentration (µg/mL)	% Recovery	Statistical data
<b>Dapagliflozin</b>				
R1 (30 µg/mL)	80.0	82.85	103.3	Mean = 102.3
R2 (50 µg/mL)	100.0	103.27	103.0	SD = 0.0088
R3 (70 µg/mL)	120.0	121.85	101.5	RSD% = 0.854
<b>Impurity 1</b>				
R1 (1 µg/mL)	1.0	1.02	102.8	Mean = 101.7
R2 (5 µg/mL)	5.0	4.98	99.3	SD = 0.0211
R3 (10 µg/mL)	10.0	10.36	103.0	RSD% = 2.077
<b>Impurity 2</b>				
R1 (1 µg/mL)	1.0	1.00	100.4	Mean = 102.2
R2 (5 µg/mL)	5.0	5.2	103.8	SD = 0.0202
R3 (10 µg/mL)	10.0	10.26	102.6	RSD% = 1.973
<b>Impurity 3</b>				
R1 (1 µg/mL)	1.0	1.03	103.9	Mean = 103.5
R2 (5 µg/mL)	5.0	5.04	100.7	SD = 0.0298
R3 (10 µg/mL)	10.0	10.66	105.9	RSD% = 2.875

24 h

96 h

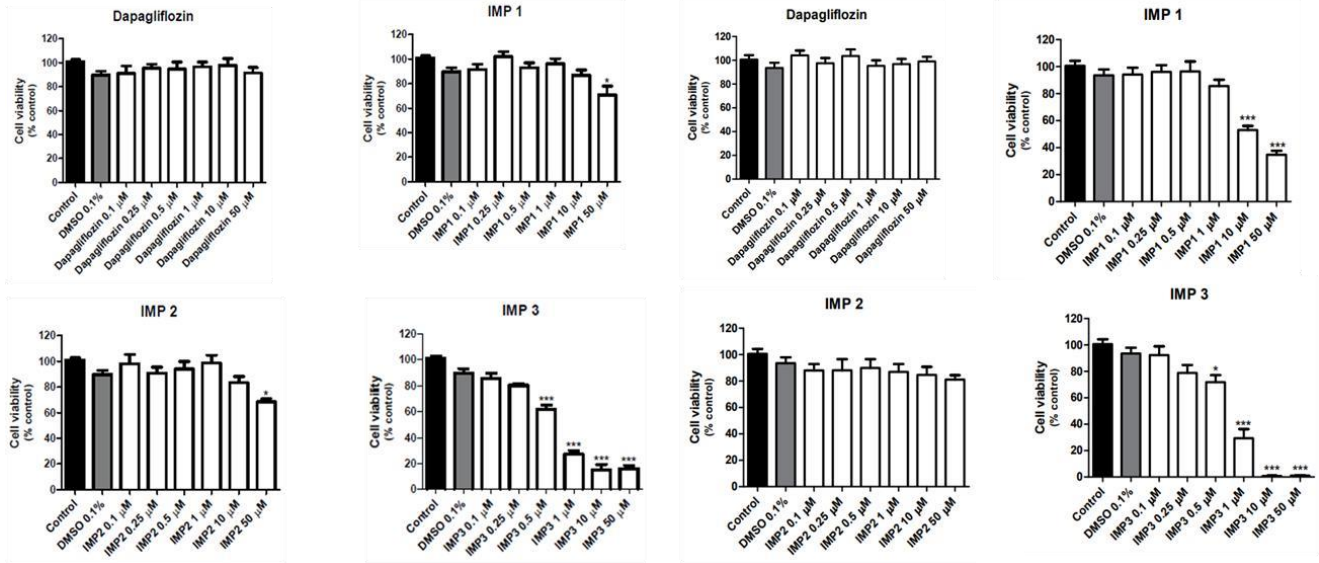


Fig 4 Cell viability evaluated by the MTT reduction assays in 3T3 cells after 24 and 96h incubation with dapagliflozin, impurity 1 (IMP 1), impurity 2 (IMP 2) and impurity 3 (IMP 3). Results are expressed as mean ± standard error of the mean. Statistical analysis performed through ANOVA/Bonferroni (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 versus control).

24 h

96 h

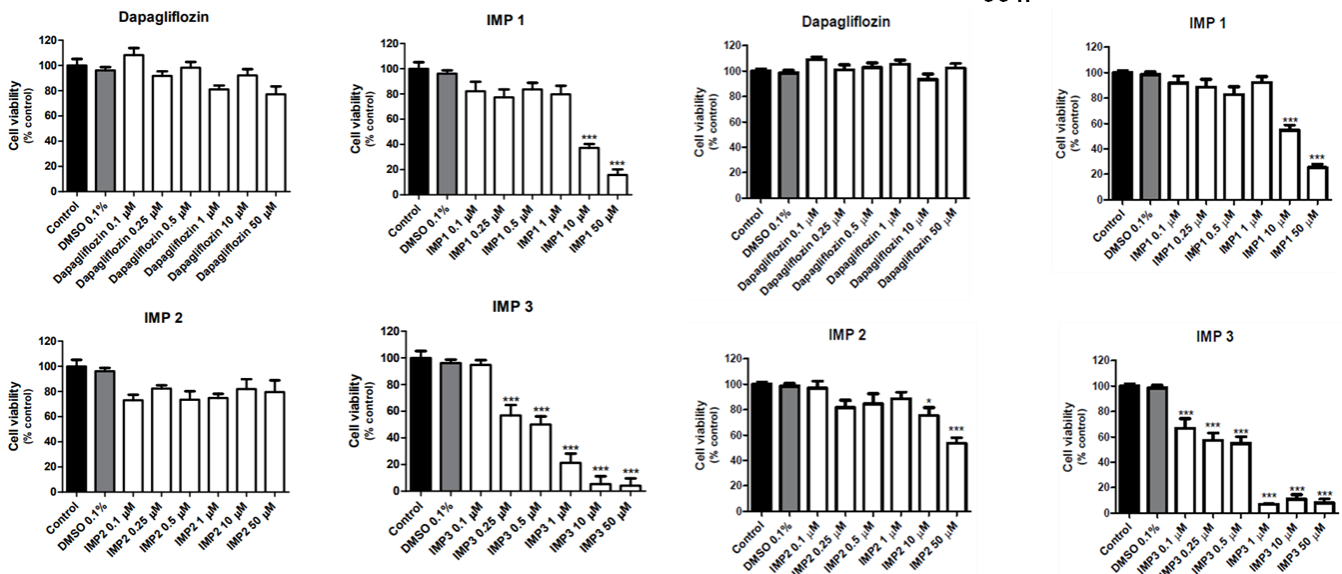


Fig 5 Cell viability by the neutral red uptake assay in 3T3 cells after 24 and 96h incubation with dapagliflozin, impurity 1 (IMP 1), impurity 2 (IMP 2) and impurity 3 (IMP 3). Results are expressed as mean ± standard error of the mean. Statistical analysis performed through ANOVA/Bonferroni (\*p < 0.05; \*\*p < 0.01; \*\*\*p < 0.001 versus control).

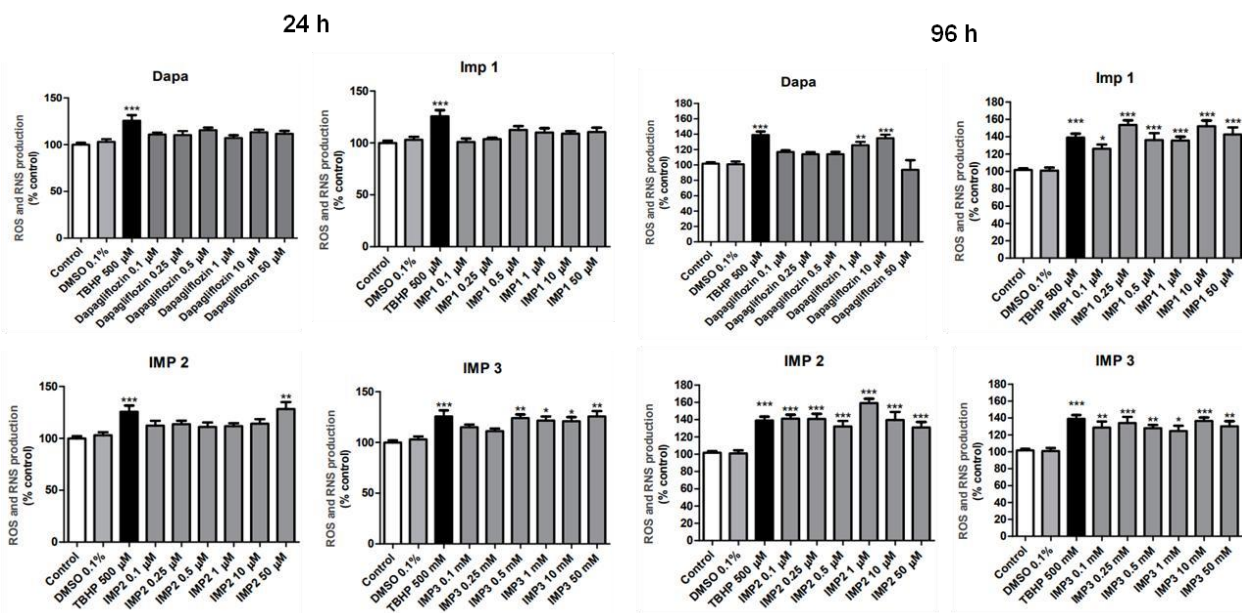


Fig 6 Results of intracellular reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species in 3T3 cells incubated with dapagliflozina (Dapa), impurity 1 (IMP 1), impurity 2 (IMP 2) and impurity 3 (IMP 3) after 24 and 96h incubation-time at 36°C. Results are expressed as percentage (%) of control conditions. Statistical comparisons were made using one-way ANOVA/Bonferroni post-hoc test (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  versus control).

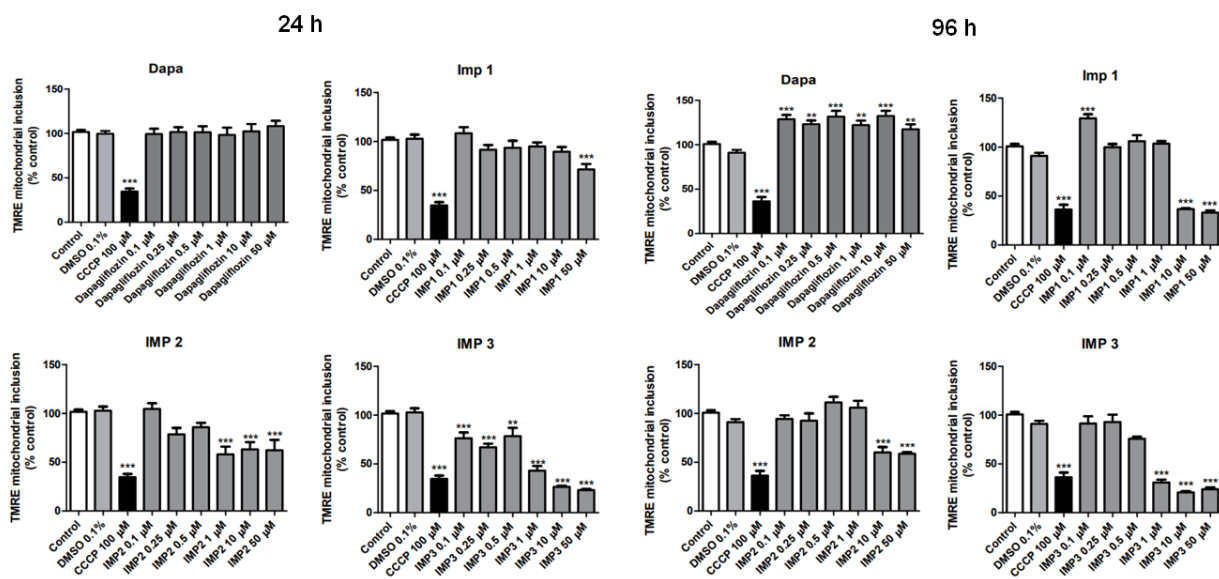


Fig 7 Evaluation of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) in 3T3 cells incubated with dapagliflozina (Dapa), impurity 1 (IMP 1), impurity 2 (IMP 2) and impurity 3 (IMP 3) after 24 and 96h incubation-time at 36°C. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Statistical analysis performed through ANOVA/Bonferroni.

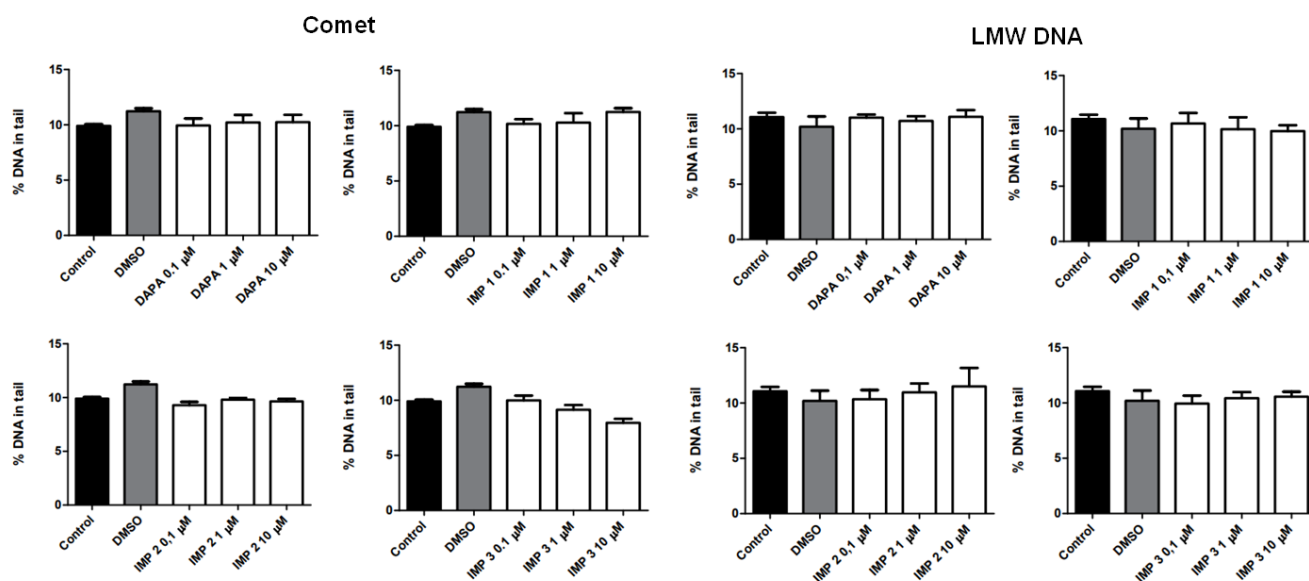


Fig 8 DNA damage measured by comet assay and LMW DNA diffusion assay in 3T3 cells incubates with dapagliflozin (Dapa), impurity 1 (IMP 1), impurity 2 (IMP 2) and impurity 3 (IMP 3) after 24 h incubation-time at 36°C. Results expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Statistical analysis performed through ANOVA/Bonferroni.

---

## 6. DISCUSSÃO GERAL

---





## 6. DISCUSSÃO GERAL

Entende-se por controle de qualidade de medicamentos o uso de diferentes tecnologias, ao longo de todo processo de produção, para monitorar as características físico-químicas e microbiológicas de todos os componentes de uma formulação, bem como do produto acabado. Com o objetivo de garantir a segurança e a eficácia dos produtos farmacêuticos durante o seu uso, o controle de qualidade tem se tornado cada vez mais essencial e relevante na rotina das indústrias farmacêuticas.

Os métodos e testes de análises vêm evoluindo ao longo dos anos, a fim de acompanhar as normas cada vez mais rígidas impostas pelas agências reguladoras. Dentre as tantas exigências previstas para a aprovação de cada lote de medicamento, destaca-se o monitoramento dos produtos relacionados ao ingrediente farmacêutico ativo.

Ao longo da cadeia produtiva de um medicamento, que se inicia na síntese do ingrediente farmacêutico ativo, até a liberação do produto acabado, vários são os processos que podem influenciar na geração de entidades químicas indesejáveis que podem trazer prejuízos para a qualidade do mesmo. Dentre as possíveis fontes de geração de impurezas, o processo de síntese do fármaco, que contempla o uso de diversos reagentes e reações químicas, e os fatores ambientais como luz, temperatura e umidade, os quais favorecem a degradação do fármaco, são as mais frequentes.

A fim de evitar que a presença de impurezas comprometa a eficácia e a segurança no uso do medicamento, as agências reguladoras vêm cobrando cada vez mais que os fabricantes monitorem a presença dessas substâncias relacionadas nos seus produtos.

O estudo de impurezas em produtos farmacêuticos compreende a quantificação e a qualificação dessas substâncias. Isso implica fazer uso de diferentes metodologias capazes de detectar quaisquer compostos indesejáveis nas amostras, mesmo que em pequenas quantidades, juntamente de ensaios que avaliem o perfil toxicológico dos mesmos.

O ICH, em seus guias Q3A (R2) "*Impurities in New Drug Substances*" e Q3B (R2) "*Impurities in New Drug Products*", orienta como os fabricantes devem proceder com estes estudos e determina quais são os limites aceitáveis das impurezas de acordo com a dose diária de uso dos medicamentos.

Para atender aos requisitos estabelecidos para a quantificação e qualificação de impurezas, é imprescindível desenvolver e validar métodos analíticos com características que os tornem capazes de detectar pequenas quantidades desses analitos nas amostras com confiança e que sejam aplicáveis à rotina dos laboratórios de controle de qualidade farmacêutico. Dessa forma, a pesquisa e o desenvolvimento analítico tem como desafio a otimização de técnicas de análise com diferentes fundamentos químicos que apresentem alta sensibilidade, boa capacidade de separação de entidades químicas e que sejam simples e reprodutíveis.

Como mencionado anteriormente, as metodologias disponíveis atualmente estão cada vez mais avançadas e cabe aos pesquisadores dessa área utilizar seus conhecimentos para tirar o melhor proveito delas e obter os melhores resultados.

Das metodologias disponíveis para o controle de qualidade de fármacos e substâncias relacionadas, a cromatografia líquida desponta como a mais empregada neste tipo de análise. Tanto a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a sua versão mais recente, a cromatografia de ultraeficiência (CLUE), são técnicas muito versáteis e que possuem as principais características necessárias para o emprego no monitoramento de impurezas na rotina dos laboratórios. Dentre elas, destacam-se, principalmente e de modo geral, a sua simplicidade, sensibilidade e boa reprodutibilidade.

A CLUE, em específico, ao fazer uso de um sistema com maior pressão juntamente com menores proporções no tamanho das colunas cromatográficas, trouxe ainda uma maior eficiência nas análises, especialmente com relação a velocidade de separação dos diferentes compostos de uma mistura. Pensando na agilidade necessária em um laboratório, análises que se concluem em pouco tempo são altamente vantajosas.

Outra técnica analítica que vem sendo cada vez mais utilizada é a eletroforese capilar (EC). Com um fundamento químico diferente da cromatografia, esta pode vir a substituí-la em determinados casos, apresentando também várias vantagens. Visto que atualmente existe uma maior preocupação com relação ao gasto de solventes orgânicos e a geração de resíduos, a EC pode ser uma boa opção quando se pretende fazer de uso de uma técnica mais sustentável.

Apesar de, em algumas situações relacionadas às características químicas dos analitos, a EC não poder ser aplicada, já existem variações no modo de separação que contornam essa desvantagem. No caso de substâncias neutras, que teoricamente não

seriam separadas pelo método de eletroforese “clássico”, é possível fazer uso de aditivos no meio eletrolítico que solucionam este problema. Neste contexto, a eletroforese micelar, na qual se faz uso de uma substância surfactante no sistema tampão, torna-se uma alternativa viável para a separação e quantificação do fármaco e suas impurezas.

Além das exigências relacionadas à identificação e quantificação dessas substâncias em uma amostra, seja da matéria-prima ou do produto acabado, os fabricantes também devem avaliar o potencial tóxico das impurezas relacionadas ao fármaco, uma vez que a presença destas pode influenciar na terapia dos pacientes.

A avaliação desse potencial pode ser realizada via programas computacionais ou pela aplicação de ensaios *in vitro*. Estes últimos são largamente empregados e são divididos em testes de citotoxicidade e genotoxicidade. Para a verificação do potencial tóxico das impurezas a nível celular, prioriza-se realizar um compilado de ensaios diferentes cujos resultados devem ser avaliados em conjunto para que se tenha um aval bem embasado. Por outro lado, a verificação do possível dano ao DNA é mais comumente realizada por meio do ensaio cometa, também conhecido como ensaio de eletroforese em gel de célula única (SCGE), é amplamente aplicado como um dos métodos padrão para esta finalidade.

Neste contexto, e tendo em vista a pouca quantidade de métodos de quantificação da dapagliflozina disponíveis na literatura e nos compêndios oficiais, o presente trabalho buscou contemplar o desenvolvimento de metodologias analíticas adequadas para a quantificação da dapagliflozina e suas impurezas de síntese, utilizando de técnicas com diferentes fundamentos. Tanto no método por CLAE quanto por EC, a dapagliflozina foi identificada e quantificada de maneira satisfatória, cumprindo com os parâmetros de validação analíticos preconizados pela legislação. Ambos os métodos foram comparados estatisticamente e demonstraram que não há diferença entre seus resultados. Já o método desenvolvido por CLUE apresentou resultados satisfatórios tanto para a quantificação do fármaco quanto das suas impurezas relacionadas. A alta sensibilidade apresentada por essa técnica, demonstrada pelos baixos limites de detecção e quantificação, é uma das suas principais vantagens para uso na quantificação de impurezas, uma vez que estas geralmente encontram-se em níveis de traços nas amostras. Além disso, a separação de todos os analitos em um reduzido tempo de análise faz com que o método por CLUE seja uma opção interessante para aplicação na rotina dos laboratórios de controle de qualidade.

Além disso, também foi realizada a qualificação das impurezas com relação ao seu potencial tóxico, a fim de predizer possíveis danos que a presença destas substâncias no produto final pode causar, especialmente quando se leva em conta o uso da dapagliflozina no tratamento de uma doença crônica. O potencial toxicológico do fármaco e suas impurezas de síntese foram realizados por ensaios de MTT, vermelho neutro, potencial de membrana mitocondrial, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e dano ao DNA através do teste cometa. Os resultados observados sugerem que as impurezas estudadas nesse trabalho possuem uma tendência a causar danos para as células, sendo estes proporcionais as suas concentrações. Dentre elas, a Impureza 3 foi a que apresentou maior potencial tóxico em todos os ensaios. Por outro lado, no ensaio cometa, o qual verifica a toxicidade a nível de DNA celular, nenhuma das substâncias testadas foi capaz de causar alterações genéticas nas condições estabelecidas.

Estes resultados contribuem para uma melhor compreensão da importância de se monitorar a presença de substâncias relacionadas nas amostras de fármacos, de modo a garantir que eventuais contaminações não sejam capazes de afetar a segurança e a eficácia dos medicamentos.

Sendo assim, incorporar os estudos de impurezas no controle de qualidade farmacêutico deve ser cada vez mais incentivado pelas agências reguladoras e cumprido pelos fabricantes, os quais devem priorizar pela implementação de técnicas analíticas adequadas para a identificação dessas moléculas em seus produtos, fazendo uso de metodologias devidamente validadas para o uso pretendido, de forma a garantir a confiabilidade dos seus resultados.

---

## **7. CONCLUSÕES**

---



## 7. CONCLUSÕES

- Os métodos propostos para a quantificação da dapagliflozina por CLAE e EC foram adequados para o objetivo proposto e não demonstraram diferenças significativas quando comparados estatisticamente;
- A validação dos métodos por CLAE e EC demonstrou que ambos são específicos, lineares, precisos, exatos e robustos, cumprindo com todos os parâmetros pré-estabelecidos;
- O método desenvolvido e validado por CLUE demonstrou ser adequado para a quantificação da dapagliflozina na presença de três impurezas relacionadas à sua síntese;
- Os resultados dos testes *in vitro* para o fármaco não apresentaram indícios de citotoxicidade nas concentrações avaliadas;
- As impurezas de síntese da dapagliflozina apresentaram diferentes níveis de citotoxicidade nos ensaios *in vitro*, em especial a Impureza 3;
- No estudo de genotoxicidade, realizado através do ensaio cometa, nenhuma das substâncias apresentou dano ao DNA celular.





---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 36, suppl.1, 2013.

AHUJA, S.; JIMIDAR, M. (Ed.). **Capillary electrophoresis methods for pharmaceutical analysis**. Elsevier, 2011.

ALVES DA CONCEIÇÃO, R. ; NOGUEIRA DA SILVA, P. ;; BARBOSA, M. L. Drugs for the Treatment of Type II Diabetes: A Visit to the Past and a Look to the Future. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 514–534, 2017.

ATKINSON, M. A. The pathogenesis and natural history of type 1 diabetes. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 11, 1 nov. 2012.

BARDEN, A. T. et al. Capillary zone electrophoresis for determination of vildagliptin (a DPP-4 inhibitor) in pharmaceutical formulation and comparative study with HPLC. **Pharmazie**, v. 69, n. 2, p. 86–91, 2014.

BARONE, B. et al. Cetoacidose diabética em adultos: atualização de uma complicação antiga. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 9, p. 1434–1447, 2007.

BONATO, P. S. Técnicas de Pré-concentração on line em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 4, p. 69–76, 2010.

BRASIL. Epidemiologia e prevenção do diabetes mellitus. **Diretrizes SBD**, p. 1–4, 2014.

BRASIL. Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, v. 2017, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diabetes Mellitus / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. **Cadernos De Atenção Básica** – Brasília : Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diabetes\\_mellitus.PDF](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diabetes_mellitus.PDF)>. Acesso em: 24 set. 2018.

CHAUDHURY, Arun et al. Clinical review of antidiabetic drugs: implications for type 2 diabetes mellitus management. **Frontiers in endocrinology**, v. 8, p. 6, 2017.

CHO, N. H. et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 138, p. 271–281, 1 abr. 2018.

DEBATA, J. et al. A New RP-HPLC Method Development and Validation of Dapagliflozin in Bulk and Tablet Dosage Form. **International Journal of Drug Development**, v. 9, n. 2, p. 48–51, 2017.

DEFRONZO, R. A. et al. Type 2 diabetes mellitus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 15019, 23 jul. 2015.

FDA. **Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry**, 2015. Disponível em:

<<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> and/or <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>>. Acesso em: 30 out. 2018

FUNARI, C. S. et al. A trade off between separation, detection and sustainability in liquid chromatographic fingerprinting. **Journal of Chromatography A**, v. 1354, p. 34–42, 8 ago. 2014.

GARCIA, C. V et al. Validation of a capillary electrophoresis method for analysis of rabeprazole sodium in a pharmaceutical dosage form. **Journal of AOAC International**, v. 88, n. 4, p. 1081–5, 2005.

GIORDANI, A.; KOBEL, W.; ULRICH, H. Overall impact of the regulatory requirements for genotoxic impurities on the drug development process. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 1–2, p. 1–15, 2011.

HAAS, B. et al. Efficacy, safety and regulatory status of SGLT2 inhibitors: focus on canagliflozin. **Nutrition & diabetes**, v. 4, n. 11, p. e143-e143, 2014.

HANSEN, S. H.; SHERIBAH, Z. A. Comparison of CZE, MEKC , MEEKC and nonaqueous capillary electrophoresis for the determination of impurities in bromazepam. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39., p. 322-327, 2005.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45–51, jan. 2003.

HOLM, R.; ELDER, D.P. Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, p. 118-135, 2016.

KALRA, S. Sodium Glucose Co-Transporter-2 (SGLT2) Inhibitors: A Review of Their Basic and Clinical Pharmacology. **Diabetes therapy : research, treatment and education of diabetes and related disorders**, v. 5, n. 2, p. 355–66, dez. 2014.

KRSTULOVIC, A. M.; LEE, C. R. Defining drug purity through chromatographic and related methods : current status and perspectives. **Journal of Chromatography B**, v. 689, p. 137–153, 1997.

LANÇAS, F. M. Aumentando a eficiência das colunas de HPLC por meio da diminuição do diâmetro das partículas da fase estacionária : até onde ? **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 1, p. 17–23, 2011.

LYRA, R. et al. Prevenção do diabetes mellitus tipo 2. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 239–249, 2006.

MALDANER, L.; SALES, C.; JARDIM, F. O Estado da Arte da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214–222, 2009.

MANASA, S. et al. Development and Validation of stability-Indicating RP-HPLC method for determination of Dapagliflozin. **Journal of Advanced Pharmacy Education & Research**, v. 4, n. 3, p. 350–353, 2014a.

MANASA, S. et al. Method Development and Validation of Dapagliflozin in API by RP- HPLC and UV-Spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 6, n. 3, p. 250–252, 2014b.

MENG, W. et al. Discovery of dapagliflozin: A potent, selective renal sodiumdependent glucose cotransporter 2 (SGLT2) inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1145–1149, 2008.

NAGLAXMI, B.; GAME, M. D. Development and Validation of Stability Indicating HPLC Method for Estimation of Dapagliflozin in Marketed Formulation. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 123–144, 2018.

NILES, A. L.; MORAVEC, R. A.; RISS, T. L. Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. **Expert Opinion on Drug Discovery**, n. June 2008, 2014.

NOGUEIRA, Nayane Magalhães et al. Méritos comparativos da Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência em escala convencional e minituarizada. **Rev. Bras. Farm**, v. 92, n. 2, p. 44-50, 2011. Disponível em: <<http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-2011-92-2-1.pdf>>. Acesso em: 19 out. 2018.

PALIOSA, P. K. et al. Quantitative determination of the  $\beta$ -methyl carbapenem doripenem in powder for injection by a stability-indicating capillary zone electrophoresis method. **Die Pharmazie**, v. 70, n. 9, p. 569–73, set. 2015.

PŁOTKA, J. et al. Green chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1307, p. 1–20, 13 set. 2013.

RAMACHANDRA, B. Critical Reviews in Analytical Chemistry Development of Impurity Profiling Methods Using Modern Analytical Techniques Development of Impurity Profiling Methods Using Modern Analytical Techniques. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 24–36, 2017.

RAO, R. Nageswara; NAGARAJU, V. An overview of the recent trends in development of HPLC methods for determination of impurities in drugs. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 33, n. 3, p. 335-377, 2003.

ROY, J. Pharmaceutical impurities--a mini-review. **AAPS PharmSciTech**, v. 3, n. 2, p. E6, 2002.

SHAKIR BASHA, S.; SRAVANTHI, P. Development and validation of dapagliflozin by reversed-phase high-performance liquid chromatography method and it's forced degradation studies. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 10, n. 11, p. 101-105, 2017.

SINGH SEKHON, B. An overview of capillary electrophoresis: Pharmaceutical, biopharmaceutical and biotechnology applications. **J Pharm Educ Res**, v. 2, n. 2, 2011.

SURA, S.; MODALAVALASA, R. R.; KOTHAPALLI, C. B. Validation of a Newly Developed Stability Indicating RP-Liquid Chromatographic Method for the Quantitative Determination of Dapagliflozin. **Der Pharma Chemica**, v. 10, n. 1, p. 93–102, 2018.

SWARTZ, Michael E. UPLC™: an introduction and review. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 7-8, p. 1253-1263, 2005.

WINGERT, N. R. et al. In vitro toxicity assessment of rivaroxaban degradation products and kinetic evaluation to decay process. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2018.