

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
**RAFAELA ZIELINSKI CAVALHEIRO DE MEIRA**

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA  
QUANTIFICAÇÃO E DISSOLUÇÃO *IN VITRO* DE DAPAGLIFLOZINA

GUARAPUAVA

2017

**RAFAELA ZIELINSKI CAVALHEIRO DE MEIRA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA  
QUANTIFICAÇÃO E DISSOLUÇÃO *IN VITRO* DE DAPAGLIFLOZINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biotecnologias aplicadas à Farmácia da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Renato de Oliveira

GUARAPUAVA

2017

Catálogo na Publicação  
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

M514d Meira, Rafaela Zielinski Cavalheiro de  
Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para  
quantificação e dissolução *in vitro* de dapagliflozina / Rafaela Zielinski  
Cavalheiro de Meira. -- Guarapuava, 2017.  
xiv, 76 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de  
concentração em Fármacos, Medicamentos e Biotecnologias aplicadas à  
Farmácia, 2017

Orientador: Paulo Renato de Oliveira  
Banca examinadora: Paulo Renato de Oliveira, Emerson Carraro, Fábio  
Seigi Murakami

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Dapagliflozina. 3. Validação. 4. Dissolução.  
5. Produto de degradação. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é  
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria  
menor se lhe faltasse uma gota.”  
(Santa Tereza de Calcutá)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela realização de mais uma etapa importante da minha vida, sem Ele nada seria possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNICENTRO e professores envolvidos, pela oportunidade.

A CAPES/CNPq pelo auxílio financeiro concedido.

Ao Prof. Dr. Paulo Renato de Oliveira, pelo qual tenho grande admiração. Obrigada por toda dedicação e paciência na orientação deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Larissa Sakis Bernardi, pela qual tenho grande estima. Obrigada pela coorientação e suporte.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Segatto Silva pela disponibilização dos equipamentos do Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos (UFSC).

À Dr.<sup>a</sup> Cassiana Mendes pelo apoio, disponibilidade e auxílio na realização dos experimentos.

Aos responsáveis e colaboradores dos Laboratórios de Nanotecnologia Farmacêutica, Ambiotec e Materiais e Compostos Orgânicos da UNICENTRO;

Aos colegas de laboratório Aline Biggi Maciel, Ana Carolina Dorigoni, Camila Nogueira, Guilherme Augusto Martins, Jaine Paula, Julia Peceguini, Lays Ramos, Patrícia Geraldis, Pedro Nicolau Severino Júnior e Raul Edison Luna Lazo por todo companheirismo. Também às queridas colegas que fiz no mestrado, Jéssica Wouk, Rossana Del Jesus e Graciela Heep, pelo auxílio.

À minha amada família pelo carinho, pela força e por todo amor que demonstraram.

Ao meu noivo Carlos Rafael Brandalize por todo amor, cuidado e atenção que sempre tem para comigo.

Aos amigos que estiverem comigo em todos os momentos, estando presentes sempre que preciso.

A todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A formulação comercial contendo dapagliflozina (Forxiga<sup>®</sup>) foi aprovada recentemente pelas agências regulatórias da Europa, do Brasil e dos Estados Unidos (EMA, ANVISA e FDA, respectivamente). O fármaco não apresenta metodologias analíticas descritas em farmacopeias e apenas dois métodos analíticos são encontrados na literatura. Dessa maneira, fez-se importante o desenvolvimento e a validação de metodologia analítica indicativa da estabilidade por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificação do fármaco em comprimidos e separação de produtos de degradação, bem como metodologia para estudos de dissolução *in vitro* com quantificação por espectrofotometria.

O método analítico para determinação de dapagliflozina em comprimidos e seus produtos de degradação por HPLC, utilizando coluna cromatográfica de fase reversa Phenomenex<sup>®</sup> Luna C<sub>18</sub> (150 mm x 4,60 mm, 5 µm) e fase móvel composta por acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (42:58, v/v), com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> foi validado, mostrando-se específico e linear na faixa de 1 a 100 µg mL<sup>-1</sup> ( $y = 7019.x + 1535$ ,  $r^2 = 0,999$ ). Os limites de detecção e quantificação foram de 0,09 e 0,28 µg mL<sup>-1</sup>, indicando um método mais sensível em relação ao encontrado na literatura. A metodologia confirmou-se precisa e exata, com a recuperação dentro dos valores especificados. A robustez foi determinada através da análise de variações realizadas ao acaso e as respostas não foram significativas ( $p > 0,05$ ). O método foi aplicado com sucesso no doseamento de comprimidos de dapagliflozina. Um produto de degradação foi encontrado no estudo de degradação forçada realizado junto à especificidade. Esse produto de degradação foi encontrado em meio às condições fotolíticas (luz UV) e identificado posteriormente em UPLC-MS/MS, caracterizando-se como um possível dímero da dapagliflozina. Até o momento ela ainda não havia sido descrita na literatura e deve ainda ser avaliado quanto a sua segurança biológica.

Para os estudos de dissolução, a metodologia analítica foi validada utilizando o aparato II e fluído gástrico simulado sem enzimas (pH 1,2) como meio de dissolução, com ensaios sendo realizados à 50 rpm. O método mostrou-se específico e linear no intervalo de 0,5 a 15 µg mL<sup>-1</sup> ( $y = 0,052.x + 0,008$ ,  $r^2 = 0,998$ ), com limite de detecção e quantificação de 0,05 e 0,15 µg mL<sup>-1</sup>. Demonstrou ser preciso e exato, com valores dentro das exigência da *International Conference Harmonization* (ICH), e também

robusto, através de abordagem sistemática (Fatorial  $2^3$ ). A aplicabilidade deste método foi confirmada com o estudo do perfil de dissolução de diferentes lotes de Forxiga<sup>®</sup>. Com as metodologias devidamente validadas vale ressaltar a importância desse procedimento tanto do ponto de vista regulatório quanto em relação à qualidade do produto farmacêutico.

**Palavras-chaves:** Dapagliflozina, Validação, Dissolução, Produto de degradação.

## ABSTRACT

The commercial formulation containing dapagliflozin (Forxiga<sup>®</sup>) was recently approved by regulatory agencies in Europe, Brazil and United States (EMA, ANVISA and FDA, respectively). The drug is not described in the pharmacopoeia and only two analytical methods are found in the literature. Thus, it is necessary the development and validation of analytical methodology for the stability indicating assay of Dapagliflozin in tablets as well as *in vitro* dissolution studies.

The analytical method for the determination of dapagliflozin tablets and their degradation products by HPLC using Phenomenex<sup>®</sup> Luna C18 reverse phase chromatographic column (150 mm x 4.60 mm, 5  $\mu$ m) and mobile phase composed of acetonitrile and formic acid 0.1% (42:58, v/v) with flow 1 mL min<sup>-1</sup> was validated, showing to be specific and linear in the range of 1 to 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> ( $y = 7019.x + 1535$ ,  $r^2 = 0.999$ ). The limits of detection and quantification were 0.09 and 0.28  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, respectively, indicating a more sensitive method compared to that found in the literature. The methodology was confirmed precise and accurate, with recovery within the specified values. The robustness was determined by Factorial experimental design. The method was successfully applied to the quantification of dapagliflozin tablets. A degradation product was found in the photolytic (UV light) degradation study and was evaluated by UPLC-MS/MS and characterized as a possible dimer of dapagliflozin. So far, this degradation product wasn't described in the literature and its safety should be further evaluated.

For the dissolution studies, the analytical methodology was validated using apparatus II and simulated gastric fluid without enzymes (pH 1.2) as the dissolution medium, with assays being performed at 50 rpm. The method was specific and linear in the interval from 0.5 to 15  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> ( $y = 0.052.x + 0.008$ ,  $r^2 = 0.998$ ), with limit detection and quantitation of 0.05 and 0.15  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, respectively. It proved to be precise and accurate, with values within the requirement made by the International Conference Harmonization (ICH), and also robust, through a systematic approach (Factor 2<sup>3</sup>). The applicability of the method was confirmed by the study of the dissolution profile of different batches of Forxiga<sup>®</sup>. With the duly validated methodologies, it is important to emphasize the importance of this procedure both from the regulatory point of view and in relation to the quality of the pharmaceutical product.

**Keywords:** Dapagliflozin, Validation, Dissolution, Degradation product.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura química da dapagliflozina propanodiol.....	17
Figura 2: Mecanismo de ação da dapagliflozina. ....	18
Figura 3: Curvas DSC e TG/DTG da dapagliflozina propanodiol.H <sub>2</sub> O.....	40
Figura 4: Espectro FTIR da dapagliflozina. ....	41
Figura 5: Micrografias de MEV: dapagliflozina (1500x) (A), (2000x) (B) e (5000x) (C). .....	43
Figura 6: Perfil de difração de raios-X de pó da dapagliflozina. ....	44
Figura 7: Microespécies de dapagliflozina e seus respectivos pHs.....	45
Figura 8: Cromatogramas de DAPA (50 µg mL <sup>-1</sup> ). ....	48
Figura 9: Curva de Linearidade da dapagliflozina em HPLC.....	49
Figura 10: Espectro de massas para identificação do produto de degradação de dapagliflozina por degradação fotolítica (luz UV) identificado em UPLC-MS/MS.....	55
Figura 11: Mecanismo de reação proposto para surgimento do produto de degradação da dapagliflozina caracterizado por seu possível dímero, com massa molecular de 817,2780 g mol <sup>-1</sup> . ....	56
Figura 12: Perfil de dissolução da DAPA em diferentes meios à 50 rpm. ....	57
Figura 13: Porcentagem de dissolução em fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2 em diferentes velocidades de agitação. ....	59
Figura 14: Varredura da solução de excipientes presentes no Forxiga <sup>®</sup> em comparação à varredura de DAPA.....	61
Figura 15: Curva de linearidade da dapagliflozina. ....	62
Figura 16: Perfil de dissolução da DAPA 5 mg de dois diferentes lotes (Lotes: A, B). .....	66
Figura 17: Perfil de Dissolução da DAPA 10 mg de três diferentes lotes (Lotes: C, D, E).....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Precisão interdica e entre analistas do método analítico para a determinação de DAPA e de seus produtos de degradação por HPLC. ....	50
Tabela 2: Exatidão do método analítico para a determinação de DAPA e de seus produtos de degradação por HPLC. ....	51
Tabela 3: Condições cromatográficas randomizadas investigadas durante o ensaio de Robustez do método analítico para a determinação de DAPA e de seus produtos de degradação por HPLC com as respectivas respostas encontradas. ....	53
Tabela 4: Concentrações de DAPA em 30 minutos de dissolução para análise de interferência de filtro. ....	56
Tabela 5: Precisão indicativa da repetibilidade do método analítico de dissolução <i>in vitro</i> da dapagliflozina. ....	63
Tabela 6: Exatidão do método analítico de dissolução <i>in vitro</i> da dapagliflozina. ....	64
Tabela 7: Ensaio da robustez (análise Fatorial 2 <sup>3</sup> ) do método analítico de dissolução <i>in vitro</i> da dapagliflozina. ....	65
Tabela 8: Eficiências de dissolução de diferentes lotes de DAPA 5 e 10 mg e seus tratamentos estatísticos. ....	67

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>APPI</b>	Fotoionização
<b>CAS n°.</b>	Número do composto químico no banco de dados da <i>Chemical Abstracts Service</i>
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>DAD</b>	Detector de Arranjo de Fotodiodos
<b>DAPA</b>	Dapagliflozina
<b>DM</b>	Diabetes <i>mellitus</i>
<b>DPR</b>	Desvio-Padrão Relativo
<b>DRXP</b>	Difração de Raios X de pó
<b>DSC</b>	Calorimetria Exploratória Diferencial
<b>ED</b>	Eficiência de Dissolução
<b>EMA</b>	Agência Europeia de Medicamentos
<b>ESI</b>	Ionização por Electrospray
<b>ESI-APCI</b>	Ionização por Electrospray e Pressão Atmosférica
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>FTIR</b>	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
<b>g mol<sup>-1</sup></b>	grama por mol
<b>h</b>	hora
<b>ICH</b>	Conferência Internacional de Harmonização
<b>kV</b>	Quilovolt
<b>mAU</b>	Mili Unidades de Absorbância
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm</b>	Milímetro
<b>m/m</b>	Massa/massa
<b>min</b>	Minuto
<b>MS</b>	Espectrômetro de Massas
<b>m/z</b>	Massa/carga

<b>LC</b>	Cromatografia Líquida
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PF</b>	Ponto de Fusão
<b>RDC</b>	Resolução da Diretoria Colegiada
<b>SCB</b>	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
<b>seg</b>	Segundo
<b>SGLTs</b>	Cotransportadores Sódio-Glicose
<b>TG</b>	Termogravimetria
<b>u.a.</b>	Unidade de Absorbância
<b>u.m.a</b>	Unidade de Massa Atômica
<b>UPLC</b>	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
<b>USP</b>	Farmacopeia Americana
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visível
<b><math>\Delta H</math></b>	Varição de entalpia
<b><math>\Delta m</math></b>	Varição de massa
<b><math>\mu g</math></b>	Micrograma
<b><math>\mu m</math></b>	Micrômetro

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1 Diabetes <i>mellitus</i> .....	15
1.2 Dapagliflozina.....	16
1.3 Caracterização do estado sólido da matéria-prima .....	19
1.4 Validação de metodologia analítica.....	20
1.4.1 Metodologia analítica para doseamento e produtos de degradação por HPLC.....	21
1.4.2 Dissolução <i>in vitro</i> .....	22
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
2.1 Objetivo Geral .....	24
2.2 Objetivos específicos .....	24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 MATERIAIS.....	25
3.2 MÉTODOS .....	27
3.2.1 Caracterização do estado sólido da matéria-prima.....	27
3.2.1.1 Calorimetria Exploratória Diferencial.....	27
3.2.1.2 Análise Termogravimétrica .....	27
3.2.1.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	27
3.2.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	27
3.2.1.5 Difração de raio-X.....	28
3.2.2 Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de dapagliflozina e de seus produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) .....	28
3.2.2.1 Validação do método de quantificação e produtos de degradação por HPLC.....	29
3.2.2.1.1 Especificidade e estudo de degradação forçada .....	29
3.2.2.1.2 Linearidade.....	30
3.2.2.1.3 Limites de detecção e quantificação .....	30
3.2.2.1.4 Precisão .....	31
3.2.2.1.5 Exatidão .....	31
3.2.2.1.6 Robustez e estabilidade da amostra .....	32
3.2.2.2 Estudo dos produtos de degradação por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS) .....	32

3.2.3	Desenvolvimento da metodologia de dissolução <i>in vitro</i> .....	33
3.2.3.1	Condições experimentais .....	33
3.2.3.2	Preparo dos meios.....	34
3.2.3.3	Validação da metodologia analítica por espectrometria no UV e estudo do perfil de dissolução.....	35
3.2.3.3.1	Especificidade .....	35
3.2.3.3.2	Linearidade.....	36
3.2.3.3.3	Limites de detecção e quantificação .....	36
3.2.3.3.4	Precisão .....	37
3.2.3.3.5	Exatidão .....	37
3.2.3.3.6	Robustez e estabilidade da amostra .....	38
3.2.3.4	Estudo do perfil de dissolução.....	38
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
4.1	Caracterização do estado sólido da matéria-prima .....	40
4.1.1	Calorimetria Exploratória Diferencial .....	40
4.1.2	Análise Termogravimétrica .....	40
4.1.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier .....	41
4.1.4	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	42
4.1.5	Difração de raio-X.....	43
4.2	Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de dapagliflozina e de seus produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) .....	44
4.2.1	Condições cromatográficas definidas .....	46
4.2.2	Validação do método de quantificação e produtos de degradação por HPLC.....	46
4.2.2.1	Especificidade e estudo de degradação forçada .....	47
4.2.2.2	Linearidade.....	48
4.2.2.3	Limite de detecção e quantificação .....	49
4.2.2.4	Precisão.....	49
4.2.2.5	Exatidão.....	50
4.2.2.6	Robustez e estabilidade da amostra .....	51
4.3	Estudo dos produtos de degradação por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS).....	54
4.4	Desenvolvimento da metodologia analítica de dissolução <i>in vitro</i> .....	56

4.4.1	Condições experimentais definidas .....	59
4.4.2	Validação da metodologia analítica por espectrometria no UV e estudo do perfil de dissolução .....	59
4.4.2.1	Especificidade .....	60
4.4.2.2	Linearidade .....	61
4.4.2.3	Limites de detecção e quantificação .....	62
4.4.2.4	Precisão .....	62
4.4.2.5	Exatidão .....	63
4.4.2.6	Robustez e estabilidade da amostra .....	64
4.5	Estudo do perfil de dissolução .....	65
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>69</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Diabetes mellitus*

O *Diabetes mellitus* (DM) pode ser definido como uma desordem metabólica que pode levar a complicações crônicas, tornando seu controle oneroso (SANTOS et al., 2011). Apresenta-se como um grupo heterogêneo de doenças, cuja hiperglicemia persistente está relacionada a problemas na secreção e/ou na ação da insulina. Ela pode ser causada tanto por fatores genéticos quanto ambientais, levando a inúmeras complicações se a doença não for controlada. Entre os problemas desencadeados por esse distúrbio estão a hiperlipidemia, a glicosilação e danos microvasculares, como a retinopatia, a nefropatia e a neuropatia, podendo também promover a incapacidade e a insatisfação sexual, levando à redução da qualidade e expectativa de vida (ADA, 2013).

Cerca de 8,3% da população mundial tem o diagnóstico da doença, sendo assim, o DM pode ser caracterizado como uma pandemia. Os dados estatísticos mostram que o número de pacientes diabéticos chegará a 360 milhões em 2030, número esse que chegou a ser de 177 milhões no ano de 2000 (RIBEIRO et al., 2014; SEO et al., 2015). No Brasil, mais de 10 milhões de pessoas são afetadas pela doença, estando entre as principais causas de internação e de mortalidade no país (FIGUEIREDO, SNOEK & BARRETO, 2013; SPD, 2015). Esta doença provoca graves problemas de saúde pública, exigindo eficiência de políticas públicas e compromisso por parte da sociedade em geral (FILHA, NOGUEIRA & MEDINA, 2014).

O DM pode ser categorizado principalmente em DM tipo 1, no qual a hiperglicemia ocorre pela falta de insulina, e em DM tipo 2, relacionado à resistência insulínica, podendo estar ou não associado à deficiência na sua secreção. Subtipos de DM também são descritos e incluem desordens pancreáticas congênitas, exócrinas ao pâncreas, bem como a síndrome de poliendocrinopatia (AHMED et al., 2006; BALAKUMAR, SUNDARAM & DHANARA, 2014).

O DM tipo 2 é o mais comum, ocorrendo em 90% dos casos diagnosticados em todo o mundo (BALAKUMAR, SUNDARAM & DHANARA, 2014). O tratamento inicial neste caso baseia-se em mudanças no estilo de vida em associação a uma



farmacoterapia individualizada, atentando para a existência de complicações cardiovasculares, bem como aos efeitos adversos. A dificuldade reside no fato de que grande parte dos hipoglicemiantes conhecidos apresenta problemas em sua eficácia quando associados a medicações para o tratamento de complicações do DM como a hipertensão e as dislipidemias (TORRE et al., 2010). É no intuito de melhorar a qualidade de vida desses pacientes que novos medicamentos têm sido desenvolvidos (MARTIN & RODRIGUES, 2010).

A alarmante prevalência do DM em associação a tratamentos inadequados, inefetivos e com muitos efeitos colaterais indesejáveis trazem reflexões importantes sobre o efeito da doença na qualidade de vida dos pacientes e de suas famílias, já que esse efeito vem a provocar tanto desgastes físicos quanto psicológicos, levando a uma redução no bem-estar dos envolvidos. Um dos pontos relevantes nesse caso é o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento dessa desordem metabólica, medicamentos esses que venham a superar as classes existentes quanto à sua efetividade e seletividade (SANTOS et al., 2011; LI et al., 2015)

Os compostos derivados dos C-aril glicosídeos estão entre os medicamentos promissores para o tratamento do DM tipo 2. Eles têm sido relatados como inibidores dos cotransportadores sódio-glicose dependentes (SGLT), dos quais se destacam o subtipo SGLT1, expresso no intestino delgado, coração, cérebro e túbulos renais, podendo assim, pela falta de especificidade causar diversos efeitos adversos, e também, o cotransportador do subtipo SGLT2, cuja expressão encontra-se a nível renal, indicando maior seletividade (WRIGHT, 2001; MENG et al., 2008).

## 1.2 Dapagliflozina

Entre os lançamentos dos compostos derivados dos C-aril glicosídeos está a dapagliflozina (DAPA), inibidor altamente potente, seletivo e reversível do SGLT2 que reduz a reabsorção de glicose pelos rins, levando a excreção do excesso de glicose pela urina, melhorando assim o controle glicêmico dos pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 (WHITE, 2015).

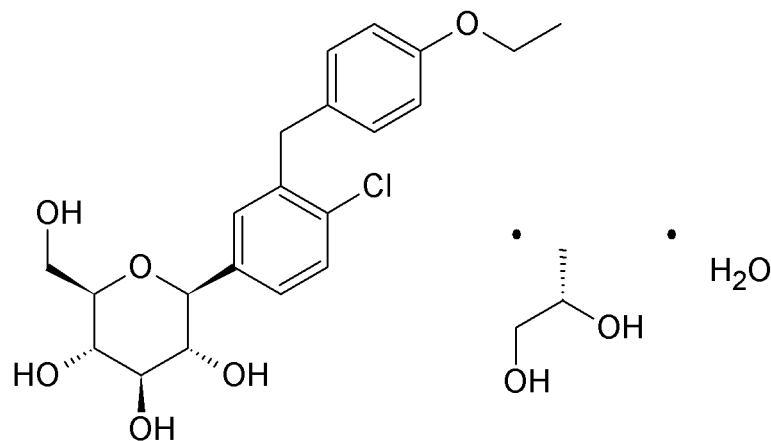
Esse fármaco foi o primeiro de sua classe a ser aprovado pela União Européia (ALBARRAN & BLASCO, 2013). Sua fórmula comercial, o Forxiga<sup>®</sup>, foi aprovada pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) em janeiro de 2014. No Brasil a

aprovação da Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) ocorreu em julho de 2013 (FDA, 2015; Bristol-Myers, 2013).

A DAPA (CAS nº. 461432-26-8) é quimicamente descrita como (1S)-1,5-anidro-1-C-[4-cloro-3-[(4-etoxifenil) metil] fenil]-D-glucitol, com fórmula molecular  $C_{21}H_{25}ClO_6$  e massa molar de  $408,87 \text{ g mol}^{-1}$ . É um pó branco cristalino, solúvel em etanol, metanol, dimetilsulfóxido (DMSO) e dimetilformamida (MANASA et al., 2014). Seu coeficiente de ionização (pKa) é 12,57 e seu ponto de fusão é  $247,56 \text{ }^\circ\text{C}$  (OBERMEIER et al., 2010; CHEMAXON, 2016).

Em sua formulação comercial, Forxiga<sup>®</sup>, DAPA encontra-se na forma de sal (propanodiol hidratado), CAS nº. 960404-48-2 (Figura 1), apresentando massa molecular de  $502,98 \text{ g mol}^{-1}$ . É um fármaco da Classe 3 no Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB) segundo a Agência Europeia de Medicamentos (EMA), caracterizado desta maneira, como altamente solúvel e pouco permeável. Porém, os laudos dos fabricantes da matéria-prima classificam sua solubilidade em água como baixa ( $<1 \text{ mg mL}^{-1}$ ), e essa contradição pode estar relacionada à diferentes estruturas dessas matéria-primas, bem como à diferentes ensaios para a determinação de suas solubilidades (EMA, 2014; CHEMAXON, 2016).

Figura 1: Estrutura química da dapagliflozina propanodiol.

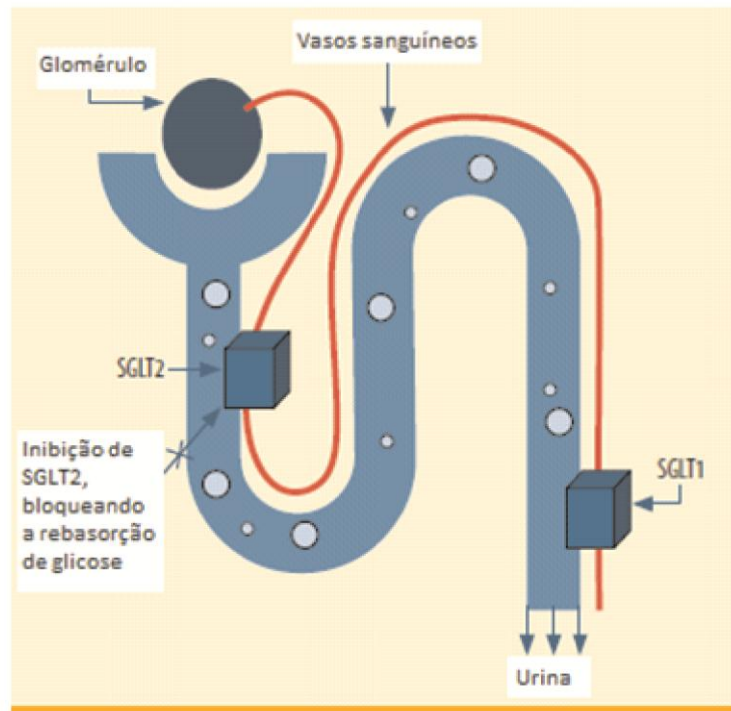


(Adaptado de BALAKUMAR, SUNDARAM & DHANARA, 2014).

O mecanismo de ação deste medicamento (Figura 2) consiste em inibir o processo de reabsorção de glicose nos túbulos renais, regulado pelos cotransportadores sódio-glicose (SGLTs) que incluem várias proteínas de membrana que transportam glicose, aminoácidos, vitaminas e íons. Os dois membros mais bem caracterizados da família dos cotransportadores são SGLT1 e SGLT2. O SGLT1

localiza-se nos segmentos distais e grande parte no trato gastrointestinal, reabsorvendo apenas 10% da glicose. O SGLT2 está ligado à regulação da glicose no rim, sendo expressa nos segmentos anteriores do túbulo proximal, reabsorvendo cerca de 90% da glicose filtrada. Através desse cotransportador ela é então transportada para o epitélio luminal, retornando ao capilar peritubular pela membrana basolateral. É inibindo o processo que representa o percentual de maior reabsorção que a dapagliflozina age, aumentando a excreção de glicose pela urina e levando, desta forma, a redução de peso e da pressão arterial (MARTIN & RODRIGUES, 2010; WHITE, 2015).

Figura 2: Mecanismo de ação da dapagliflozina.



(Adaptado de MARTIN & RODRIGUES, 2010).

A DAPA, em sua formulação comercial, é rapidamente absorvida após a administração oral, sendo eliminada através da ativação do metabolito inativo dapagliflozina 3-O-glicuronídeo pela enzima Uridina Glucoronosiltransferase, isoforma 1A9 (UGT1A9). Estudos clínicos demonstraram que esse princípio ativo apresenta um perfil de segurança aceitável e favorável em relação ao controle metabólico, frente a outros antidiabéticos há mais tempo conhecidos. Os estudos de

pós-comercialização exigidos pelo FDA ainda estão em andamento (KASICHAYANULA et al., 2011; MARANGUI et al., 2014).

### 1.3 Caracterização do estado sólido da matéria-prima

A caracterização físico-química de um fármaco é importante na determinação de sua estrutura e de suas propriedades, prevendo seu comportamento frente a condições não estudadas ou mesmo relatadas, principalmente quando se trata de uma nova formulação. É considerada um pré-requisito regulatório e científico para o desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas e também padronização de composto (STRENG, 1997; BERNARDI et al., 2009).

Os métodos mais adequados para o estudo do estado sólido de um ativo incluem, dentre outras, as seguintes análises: Calorimetria exploratória Diferencial (DSC), Termogravimetria (TG), Difração de raio-X de pó, Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (HILFIKER, 2006).

As análises térmicas são aplicadas na área farmacêutica desde 1970 e caracterizam-se por um conjunto de técnicas em que uma propriedade da amostra é medida em função do tempo ou temperatura (GIRON, 2002).

A DSC é amplamente utilizada como um método padrão para a análise térmica da mudança de fase dos materiais. É um método rápido e destrutivo, capaz de detectar com facilidade interações físicas, por isso tem sido muito aplicada na análise de interações físico-químicas entre ingredientes farmacêuticos (CHADHA et al., 2013; KUMARASAMY et al., 2016).

A TG é apropriada para se obter parâmetros cinéticos químicos, sendo caracterizada por uma técnica que avalia, em atmosfera controlada, a perda de massa em decorrência da mudança de temperatura ou tempo. É um método que oferece informações básicas sobre as propriedades térmicas do material e a sua composição (BRASIL, 2010b; FUENTE et al., 2011; DING et al., 2016).

Análises de DSC e TG são amplamente associadas, já que a primeira fornece resultados a respeito dos efeitos calorimétricos e a seguinte sobre as variações na massa, levando a importantes considerações sobre a relação existente entre a necessidade calórica dependente da temperatura e as reações que a envolvem.

Podem ser aplicadas no desenvolvimento e na caracterização de novos produtos, e avaliação dos processos produtivos. Apresentam a grande vantagem de requerer uma pequena quantidade de amostra, o que é importante durante a etapa de desenvolvimento de produtos (HE, YI & BAI, 2006; SILVA, PAOLA & MATOS, 2007; CHADHA & BHANDARI, 2014).

A difração de raios-X é uma técnica empregue na medição e caracterização de estruturas cristalográficas, capaz de fornecer informações de polimorfos, estado de solvatação e grau de cristalinidade. É uma ferramenta não destrutiva, rápida e de baixo custo, importante na identificação de materiais ilícitos, explosivos e substâncias controladas, como fármacos (PHADNIS, CAVATUR & SURYANARAYANAN, 1997; DICKEN et al., 2015).

A análise em FTIR fornece informações sobre grupos funcionais e moleculares, sendo uma técnica muito utilizada para investigar possíveis interações químicas entre princípios ativos e excipientes, bem como mudanças na cristalinidade do composto. O método não é destrutivo e possibilita a obtenção de resultados de alta qualidade (ROUMELI et al., 2013; PELUSI et al., 2016).

Micrografias obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura permitem a observação de estruturas de superfície a partir da irradiação de um feixe fino de elétrons sobre a amostra. Esse método tem sido amplamente utilizado na análise e caracterização de materiais, no processo de desenvolvimento farmacotécnico, diagnósticos médicos, dentre tantas outras aplicações (DUARTE et al., 2003; CUFFINI, JÚNIOR & TOMBARI, 2009).

#### **1.4 Validação de metodologia analítica**

A validação de metodologia analítica tem recebido atenção considerável na literatura devido a sua importância na indústria farmacêutica, por esse motivo, com a inserção do medicamento tanto no mercado brasileiro quanto no mercado internacional e considerando-se que não existem métodos farmacopeicos para doseamento e produtos de degradação da dapagliflozina em comprimidos por HPLC, nem metodologia de dissolução *in vitro*, entende-se como necessário o desenvolvimento e a validação de métodos capazes de garantir a qualidade das análises através de resultados confiáveis (SHABIR, 2003).

Os métodos devem seguir as exigências de órgãos reguladores como a ANVISA, presente na RE nº899 de 29 de maio de 2003 e também nas normas de validação da *International Conference on Harmonisation* (ICH). A validação deve então garantir, por meio de estudos experimentais, que o método seja compatível com as aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, faz-se necessária à aplicação de alguns parâmetros como precisão, exatidão, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, especificidade, reprodutibilidade, estabilidade e recuperação adequadas à análise (BRASIL, 2003, ICH, 2005).

#### **1.4.1 Metodologia analítica para doseamento e produtos de degradação por HPLC**

Na indústria farmacêutica sugere-se que a validação de metodologia por HPLC seja direcionada e assegurada pelas diretrizes dos seguintes órgãos regulamentadores: ICH, FDA e *U.S. Pharmacopeial* (USP) (SHABIR, 2003). As exigências da entidade brasileira, ANVISA, são baseadas nessas regulamentações mundiais (BRASIL, 2003).

O desenvolvimento da metodologia tende à otimização do processo e a validação consiste em garantir a confiabilidade dos resultados obtidos a partir das análises de doseamento e produtos de degradação de um fármaco, neste caso, por cromatografia líquida em fase reversa (RP-HPLC), sendo ambos essenciais no decorrer dos processos farmacêuticos (SHABIR, 2003, SINGH, 2013).

Existem apenas uma metodologia analítica de doseamento por HPLC para comprimidos de dapagliflozina na literatura (MANASA et al., 2014b), e duas indicativas de estabilidade sem que haja menção de qualquer produto de degradação (MANASA et al., 2014a; MOHAMMAD & GOWRI, sendo que ambas não se apresentam descritas em farmacopeias, isso porque o fármaco foi recentemente aprovado pela ANVISA e pelo FDA.

Entende-se a exigência do FDA, do ICH e da ANVISA para com o desenvolvimento e validação de um método indicativo de estabilidade, também chamado método para produtos de degradação, como um modo de assegurar a eficácia e a segurança do medicamento, já que há uma grande preocupação frente à estabilidade química das moléculas farmacêuticas. Os ensaios são realizados após

uma degradação forçada do composto em estudo que simulam alguns dos processos pelos quais o fármaco pode vir a passar em seu tempo de prateleira como hidrólises ácida e básica, oxidação, bem como degradações fotolíticas e térmicas (ICH, 2006; BRASIL, 2013; BLESSY et al., 2014).

Idealmente os produtos de degradação encontrados devem ser identificados. A identificação é possível pela combinação de técnicas analíticas, geralmente a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (RMN) (GALMIER et al., 2005; ICH, 2006).

#### **1.4.2 Dissolução *in vitro***

A dissolução é o processo de liberação do fármaco de sua forma farmacêutica, caracterizando a sua solubilização nos meios gastrointestinais, tornando-o assim, disponível para a absorção no organismo. O ensaio de dissolução é então, o teste *in vitro* que estabelece a velocidade e a extensão da liberação do princípio ativo em determinado meio (CHOWDARY & RAJYALAKSHMI, 1987; MARCOLONGO, 2003).

O teste de dissolução é essencial nas etapas do desenvolvimento de um fármaco até a otimização de sua fórmula. É utilizado durante a produção industrial, incluindo para a liberação de lotes e testes de estabilidade, demonstrando que a formulação atende às exigências dos órgãos regulamentadores e às monografias já existentes (MANADAS et al., 2002; BRASIL, 2010c).

Alterações na velocidade de dissolução nas formas farmacêuticas de liberação imediata, como o comprimido de DAPA, podem afetar a biodisponibilidade e por isso, exige-se que os testes de dissolução sejam capazes de identificar alterações que comprometam sua qualidade (ICH, 1999). Dessa forma, as condições de ensaio devem ser selecionadas criteriosamente, de forma que sua escolha adequada leve a um aumento na capacidade de detectar desvios na qualidade do produto. A uniformização dos procedimentos também colabora com a execução dos procedimentos conforme as exigências das entidades reguladoras, que determinam a realização da validação da metodologia analítica caso ainda não esteja descrita em monografia oficial (MANADAS et. al., 2002; BRASIL, 2003, BRASIL, 2010c).

A DAPA é o caso de um fármaco que ainda não apresenta metodologia de dissolução descrita em monografia oficial, apresentando apenas um método

encontrado na literatura (FDA, 2015). Portanto, para elucidação de seu comportamento *in vitro*, faz-se necessário o desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica capaz de assegurar a confiabilidade dos resultados encontrados nos ensaios de dissolução (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

O estudo do perfil de dissolução é um dos ensaios para a determinação da equivalência farmacêutica. Caracteriza-se por ser um teste imprescindível para estabelecer a intercambialidade entre o medicamento similar/genérico e seu referência, quando há quebra ou expiração de patente do fármaco inovador (BRASIL, 2014).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para determinação de dapagliflozina e de seus produtos de degradação por HPLC, e de metodologia analítica para análise do perfil de dissolução de diferentes lotes de dapagliflozina.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterização da matéria-prima de dapagliflozina;
- Desenvolvimento de metodologia analítica para análise teor e produto de degradação por HPLC;
- Validação da metodologia desenvolvida;
- Estudo dos produtos de degradação por UPLC-MS/MS;
- Doseamento de formulações comerciais de Forxiga<sup>®</sup>;
- Desenvolvimento de metodologia analítica de dissolução *in vitro*;
- Validação da metodologia desenvolvida para dissolução;
- Análise do perfil de dissolução de diferentes lotes de dapagliflozina.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### Materiais, Substâncias e Reagentes

- Acetato de sódio trihidratado (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).
- Acetonitrila grau cromatográfico (Tedia, Fairfield, OH, EUA).
- Ácido clorídrico (Synth, Diadema SP, Brasil).
- Ácido fórmico (Synth, Diadema SP, Brasil).
- Ácido fosfórico (Sigma-Aldrich, SP, Brasil).
- Água ultrapura Milli-Q (Merck Millipore, Darmstadt, HE, Alemanha).
- Álcool polivinílico (Metaquímica, Jaraguá do Sul, SC, Brasil).
- Biftalato de potássio (Biotec, Pinhais, PR, Brasil).
- Celulose microcristalina PH 101 (Sintética, Capivari, SP, Brasil).
- Cloreto de sódio (Biotec, Pinhais, PR, Brasil).
- Crosprovidona (doação Prati-Donaduzzi, Toledo, Paraná, Brasil).
- Dapagliflozina propanodiol matéria-prima. Lote: 20150207; Validade 06/02/2017. (Anhui Lianchuang Biological Medicine Co., Ltd, Anhui, China).
- Dióxido de silício (Gemini, Anápolis GO, Brasil).
- Dióxido de titânio (Kalium Chemical, São Paulo, SP, Brasil).
- Estearato de magnésio (Henrifarma, São Paulo, SP, Brasil).
- Filtro de seringa Full Flow 10 µm (Agilent, Santa Clara, EUA).
- Filtro de seringa Nylon 0,22 µm (Sterlitech, Washington, EUA).
- Forxiga<sup>®</sup> 5 mg (Lotes: A, B) e 10 mg (Lotes: C, D, E) (AstraZeneca, Cotia, SP, Brasil).

Observação: Por ser um fármaco em regime de patente só há no mercado farmacêutico seu medicamento referência, por isso o ensaio com lotes do mesmo produto.

- Fosfato de cálcio dibásico di-hidratado (Henrifarma, Cambuci, SP, Brasil).
- Fosfato de potássio monobásico (Dinâmica, Diadema SP, Brasil).
- Hidróxido de sódio (Biotec, Pinhais, PR, Brasil).
- Lactose anidra (Sigma-Aldrich St . Louis, MO, EUA).

- Lactose monoidratada (Pharma Nostra Anápolis, GO, Brasil).
- Macrogol (Biotec, Pinhais, PR, Brasil).
- Membrana acetato de celulose de poro 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, São Paulo, SP, Brasil).
- Metanol grau cromatográfico (Tedia, Fairfield, OH, EUA).
- Papel filtro quantitativo 28  $\mu\text{m}$  (J Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil).
- Silicato de magnésio (Braschemical, São Paulo, SP, Brasil).

### Equipamentos

- Balança analítica Shimadzu AUX220 (Shimadzu, Kyoto, Japão).
- Bomba à vácuo Pro-Tools (Pró Análise, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil).
- Calorímetro DSC-60 (Shimadzu, Kyoto, Japão).
- Cromatógrafo LC 10AVP (Shimadzu, Kyoto, Japão).
- Cromatógrafo de ultra eficiência acoplado à espectrometria de massas UPLC-MS/MS Xevo G2-S (Waters, Massachusetts, EUA).
- Difrátômetro de raios X de pó D2 (Bruker, Massachusetts, EUA).
- Dissolutor 708-DS (Agilent, Santa Clara, EUA).
- Espectrofotômetro FTIR (Frontier, Perkin Elmer, Massachusetts, EUA).
- Estufa de secagem (Biopar, Porto Alegre, RS, Brasil).
- Espectrofotômetro V-630 Bio (Jasco, Kyoto, Japão).
- Luxímetro digital MIm 1011 (Minipa, São Paulo, SP, Brasil).
- Medidor digital de luz UV MRU-201 (Instrutherm, São Paulo, SP, Brasil).
- Microscópio eletrônico de varredura VEGA 3 SB<sup>®</sup> (Tescan, Libušina třída, Brno, República Tcheca).
- pHmetro Edge (Hanna, Carrollton, Texas, EUA).
- Sistema de purificação Milli-Q (Merck Millipore, Darmstadt, HE, Alemanha).
- Termobalança TGA-50 (Shimadzu, Kyoto, Japão).

## **3.2 MÉTODOS**

### **3.2.1 Caracterização do estado sólido da matéria-prima**

#### **3.2.1.1 Calorimetria Exploratória Diferencial**

Para a obtenção das curvas de DSC utilizou-se a faixa de temperatura de 25-300 °C com razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> em atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL min<sup>-1</sup>). As análises foram realizadas utilizando cadinhos de alumínio com cerca de 2 mg de amostra. A calibração do equipamento de DSC foi realizada com padrão de referência de Índio (PF 156,6 °C;  $\Delta H_{fus} = -28,54 \text{ g}^{-1} \text{ J}$ ) e Zinco (PF 419,5 °C).

#### **3.2.1.2 Análise Termogravimétrica**

O ensaio de TG foi realizado utilizando cadinho de platina, com cerca de 4 mg de amostra, sob atmosfera dinâmica de N<sub>2</sub> (100 mL min<sup>-1</sup>) e razão de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>, na faixa de temperatura de 30 a 600 °C.

#### **3.2.1.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier**

O espectro de FTIR para a dapagliflozina foi obtido dentro de um intervalo de varredura de 4000-600 cm<sup>-1</sup>, com uma média de mais de 32 varreduras e resolução espectral de 4 cm<sup>-1</sup>. Um espectro de fundo (branco) foi realizado.

As informações espectrais foram obtidas utilizando reflexão difusa, a partir da incidência e reflexão de luz em pó de DAPA (quantidade suficiente para completar o disco de suporte para amostra).

#### **3.2.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura**

Um microscópio eletrônico de varredura (VEGA 3 SB<sup>®</sup>, TESCAN) com detector de elétron secundário (SE) do tipo Everhart-Thornley, para alto vácuo, com grade frontal de potencial positivo e filamento de voltagem de 30kV foi utilizado para a obtenção das fotomicrografias. O processamento dos dados foi realizado através do

software VegaTC<sup>®</sup>. As amostras foram montadas em suporte de alumínio e fixadas em fita adesiva de dupla face de carbono.

### **3.2.1.5 Difração de raio-X**

A análise de difração de raios X de pó foi realizada em difratômetro com tubo de CuK $\alpha$ , na faixa de 5-40° (2 $\theta$ ) com tempo de passo de 1s e incremento de 0,05°. Para que não houvesse problema de orientação preferencial, as amostras de dapagliflozina foram colocadas minuciosamente sobre o porta amostras mantido a 5 rpm durante a análise.

### **3.2.2 Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de dapagliflozina e de seus produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

O desenvolvimento da metodologia analítica para teor e produto de degradação por HPLC foi iniciado por uma revisão bibliográfica de caráter contínuo, sendo possível levantar dados característicos do fármaco, como sua estrutura molecular, solubilidade, constante de ionização (pK $a$ ), ponto de fusão, dentre outras informações físico-químicas.

Dentre as variáveis presentes no sistema cromatográfico fixou-se o fluxo da fase móvel (1 mL min<sup>-1</sup>) e o volume de injeção (20  $\mu$ L). O comprimento de onda foi estabelecido com a utilização do detector de arranjo de fotodiodos (DAD) do equipamento.

A concentração da solução padrão a ser injetada no equipamento foi determinada ensaiando as concentrações usuais para o equipamento, sendo fixada conforme os resultados apresentados.

Os ensaios englobaram a análise da temperatura do forno, levantando resultados à 30 °C e também sem o controle da temperatura.

As fases móveis testadas contaram com a presença de acetonitrila:ácido fosfórico 0,1% nas proporções de 45:55 (v/v) e 40:60 (v/v), acetonitrila:ácido fórmico 0,1% nas razões de 45:55, 42:58 e 40:60 (v/v), e acetonitrila:água Milli-Q<sup>®</sup> na proporção de 40:60 (v/v). A eluição durante todo o desenvolvimento foi isocrática.

Três colunas cromatográficas de fase reversa puderam ser testadas: a Phenomenex<sup>®</sup> Luna C<sub>18</sub> (150 mm x 4,60 mm, 5 µm), a Phenomenex<sup>®</sup> Synergi C<sub>18</sub> (150 mm x 4,60 mm, 5 µm) e a Waters Nova-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (150 mm x 3,9 mm, 4 µm).

As fases móveis foram previamente filtradas à vácuo em membrana acetato de celulose de poro 0,45 µm. O tempo de corrida inicial foi de 20 minutos.

### **3.2.2.1 Validação do método de quantificação e produtos de degradação por HPLC**

O método analítico foi validado através da análise dos parâmetros exigidos pela ICH Q2 (R1): especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez. Juntamente com a especificidade o ICH determina o estudo da degradação forçada, para determinar a capacidade do método frente aos possíveis produtos de degradação (FDA, 2001; ICH, 2005).

#### **3.1.2.1.1 Especificidade e estudo de degradação forçada**

A especificidade foi realizada com o intuito de comprovar a capacidade do método em determinar a dapagliflozina em meio à outros compostos, mesmo que próximos de suas características, como seus produtos de degradação (ICH, 2005).

A análise de produtos de degradação de novos medicamentos, através de método indicativo de estabilidade é componente chave nas orientações divulgados pelo ICH. O método totalmente validado pode fornecer dados para auxiliar na identificação de possíveis produtos e vias de degradação, bem como estudos de estabilidade de medicamentos, garantindo a quantificação do ativo em meio a esses produtos de degradação (KARAGEOGOU & SAMANIDOU, 2014; FDA, 2015).

No presente estudo, uma solução padrão (500 µg mL<sup>-1</sup>) foi submetida à degradação forçada em meio ácido (5 M de HCl durante 4 dias a 25 °C), básico (5 M de NaOH durante 4 dias a 25 °C), oxidativo (10% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante 4 dias a 25 °C), térmico (80 °C durante 4 dias) e fotolítico (simulação de luz do dia com uma iluminação total de 1,2 milhões lux e luz UV com intensidade de 360 µW/cm<sup>2</sup>, com alíquotas sendo retiradas diariamente) (BRASIL, 2012). Após estes procedimentos, as amostras foram diluídas em fase móvel para uma concentração final de 50 µg mL<sup>-1</sup>.

<sup>1</sup>. Uma solução placebo (branco) obtido por mistura de todos os excipientes (celulose microcristalina, lactose anidra, crospovidona, dióxido de silício, estearato de magnésio, álcool polivinílico, dióxido de titânio, macrogol, silicato de magnésio e óxido de ferro amarelo) presente no comprimido também foi injetado para a determinação da interferência dos excipientes. Detector de DAD foi utilizado para provar que os picos detectados foram espectralmente puros (BRASIL, 2013).

### **3.2.2.1.2 Linearidade**

Este parâmetro foi realizado para demonstrar a proporcionalidade existente entre os resultados e a concentração do fármaco na amostra (ICH, 2005).

Para determinar a linearidade, três curvas de calibração, cada qual com a análise de sete concentrações de DAPA (1, 5, 10, 25, 50, 75 e 100 µg mL<sup>-1</sup>) foram construídas. As diluições foram realizadas a partir de uma solução padrão de 500 µg mL<sup>-1</sup> de DAPA e em fase móvel. Para cada curva, as injeções foram realizadas em triplicata.

### **3.2.2.1.3 Limites de detecção e quantificação**

O limite de detecção e o limite de quantificação estão relacionados com a concentração mais baixa em que um analito pode ser detectado e quantificado, respectivamente, com precisão e exatidão aceitáveis no último caso (BRASIL, 2003; ICH, 2005).

Estes parâmetros foram determinados através da inclinação da curva e do desvio padrão obtido a partir das médias dos interceptos das curvas feitas em triplicatas na avaliação da linearidade, utilizando um modelo de regressão linear, de acordo com as equações ICH (Equação 1 e 2). Os valores calculados foram confirmados experimentalmente (ICH, 2005).

$$LD = \frac{DP \times 3}{IC} \quad (\text{Equação 1})$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

DP = é o desvio padrão médio do intercepto,

IC = é a inclinação da curva de calibração.

#### 3.2.2.1.4 Precisão

Os ensaios para analisar a precisão do método foram realizados por meio da avaliação de seis amostras, igualmente preparadas, inicialmente com concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo diluídas em fase móvel até chegarem a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e então submetidas às mesmas condições cromatográficas, procedimento correspondente a repetibilidade. A precisão intermediária foi determinada em dois dias diferentes (interdia), bem como por outros três analistas (entre analistas).

Os resultados encontrados foram comparados estatisticamente entre si e com o padrão de DAPA na mesma concentração, e não poderiam apresentar DPR acima de 2% entre as análises (BRASIL, 2003).

#### 3.2.2.1.5 Exatidão

A exatidão foi avaliada pela recuperação das soluções padrão de DAPA adicionadas a uma solução placebo contendo todos os excipientes da formulação. As análises foram realizadas com concentrações previamente determinadas de 40, 50 e  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ , correspondente a 80, 100 e 120% da concentração definida para a validação da metodologia, respectivamente. As diluições foram realizadas em fase móvel e a exatidão foi avaliada em triplicata, sendo expressa em termos de porcentagem de recuperação, segundo a Equação 3 (ICH, 2005):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$



### 3.2.2.1.6 Robustez e estabilidade da amostra

O estudo da robustez é crítico na avaliação do desempenho do método frente a pequenas alterações operacionais, não devendo haver alterações consideráveis do teor declarado da amostra analisada nas condições cromatográficas em validação (ICH, 2005).

A análise para esse parâmetro foi realizado através de mudança nas condições inerentes ao método desenvolvido, tais como fluxo e composição da fase móvel, temperatura da coluna e a concentração da água acidificada. O novo guia do FDA para procedimentos e métodos analíticos para validação de fármacos e produtos biológicos recomenda que seja feita uma abordagem sistemática para o estudo de robustez, a fim de que se entenda o efeito das pequenas mudanças em um procedimento analítico (FDA, 2015). Desse modo, foi realizado um desenho experimental do tipo Box-Behnken (Statistic® versão 8 do software). Os resultados foram analisados estatisticamente (ANOVA).

A estabilidade da amostra foi realizada para demonstrar que a amostra se manteve íntegra pelo período de 48 horas. A variação do resultado em relação ao teor declarado pela amostra recém preparada e analisada deve estar entre 98 e 102% (ICH, 2005).

Após a validação de todos os parâmetros da metodologia proposta, o método foi aplicado no doseamento de comprimidos contendo 5 mg (lotes: A, B) e 10 mg (lotes: C, D, E) de DAPA. A análise foi realizada em triplicata.

### 3.2.2.2 Estudo dos produtos de degradação por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)

O estudo dos produtos de degradação foi realizada com UPLC acoplado à espectrometria de massas. Utilizou-se espectrômetro de massa triplo quadrupolo equipado com fontes ESI-APCI (em inglês, *electrospray in atmospheric pressure chemical ionization*) e APPI (fotoionização). A análise dos dados foram feitas com o software MassLynx™.

A solução de DAPA exposta à luz UV foi diluída até a concentração de 50 µg mL<sup>-1</sup> e introduzidos no espectrômetro de massa por infusão direta. Os parâmetros

que trouxeram melhores respostas foram: ESI positivo no potencial de 6,67 kV e os dados foram adquiridos em  $m/z$  no intervalo de 100 e 1300 u.m.a.

### 3.2.3 Desenvolvimento da metodologia de dissolução *in vitro*

O desenvolvimento da metodologia analítica da dissolução de DAPA foi realizado concomitantemente com o estudo do seu perfil de dissolução, já que ambas as respostas encontradas determinaram as melhores condições experimentais.

O estudo do perfil de dissolução foi feito conforme o preconizado pela USP 38-NF 33 e pela RDC N° 31/2010.

#### 3.2.3.1 Condições experimentais

- Aparatos e velocidade de agitação: Aparato II (pá) a 50 rpm, 60 rpm e 75 rpm;
- Meios de dissolução: fluído gástrico simulado sem enzimas (pH 1,2), tampão acetato pH 4,5, fluído intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8), ácido clorídrico 0,1 M e água Milli-Q®;
- Temperatura:  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ;
- Registro do pH no início e no final do experimento;
- Volume do meio: 900 mL;
- Leitura em UV,  $\lambda = 224 \text{ nm}$ .

O estudo das influência de filtros deu início aos testes de desenvolvimento da metodologia (USP, 2015). Os filtros analisados foram o de papel quantitativo (28  $\mu\text{m}$ ) e os de seringa: o filtro de Nylon, 0,22  $\mu\text{m}$  e o filtro Full Flow® 10  $\mu\text{m}$ .

As dissoluções das formulações contendo 5 mg de DAPA foram realizadas com seis comprimidos para cada um dos meios citados nas condições experimentais. Os tempos de coleta das alíquotas das cubas foram: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 60 min.

As curvas de calibração foram diluídas nos respectivos meios para a análise de cada ensaio. As diluições partiram de 10 mg de DAPA dissolvidos em 10 mL de metanol, resultando em uma concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>.

Foram realizados ensaios para a determinação da melhor velocidade de agitação (50, 60 e 75 rpm) (USP, 2015). Nesses testes, alíquotas foram retiradas em menores tempos: 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 10 e 20 min. A análise dos dados dos perfis de dissolução foram realizados por comparação estatística, através da aplicação dos fatores *f1* (fator de diferença) e *f2* (fator de semelhança), Equações 4 e 5, respectivamente (BRASIL, 2004; BRASIL, 2010a)

$$f1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |Rt - Tt|}{\sum_{t=1}^n Rt} \right\} \times 100 \quad \text{(Equação 4)}$$

$$f2 = 50 \log \left\{ \left[ 1 + 1/n \sum_{t=1}^n (Rt - Tt)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right\} \quad \text{(Equação 5)}$$

Em que: n= é o número de tempos considerados,

*Rt* e *Tt* = representam os valores médios das porcentagens dissolvidas no tempo t para as formulações referência e teste, respectivamente.

Para todas as análises houve a retirada de 10 mL da solução presente nas cubas com posterior reposição de meio de dissolução.

### 3.2.3.2 Preparo dos meios

Fluído gástrico simulado sem enzimas (pH 1,2):

Em um balão volumétrico de 1000 mL foram dissolvidos 2,0 g de cloreto de sódio em 7,0 mL de ácido clorídrico (37%), completando o volume com água destilada. O pH foi ajustado para 1,2 (USP, 2015).

Solução tampão pH 4,5:

Foram dissolvidos 2,99 g de acetato de sódio tri-hidratado em 500 mL de água destilada em um balão volumétrico de 1000 mL. Adicionou-se 14 mL de ácido acético a 2N, completando o volume com água destilada. O pH foi ajustado para 4,5 (USP, 2015).

Fluído intestinal simulado sem enzimas (pH 6,8):

Dissolveram-se 6,8 g de fosfato de potássio monobásico em 250 mL de água destilada. A essa solução foi adicionado 77 mL de hidróxido de sódio 0,2 M. Completou-se o volume com água destilada o suficiente para fazer 1000 mL de solução. O pH foi ajustado para 6,8 (USP, 2015).

Ácido Clorídrico 0,1 M:

Em um balão volumétrico de 1000 mL foram adicionados 8,4 mL de ácido clorídrico (37%), completando o volume com água destilada (USP, 2015).

Água Milli-Q:

A água utilizada apresentou um pH de 7,76.

Os ajustes de pH foram realizados com soluções de hidróxido de sódio 0,2 M ou ácido clorídrico 0,2 M. Os meios foram filtrados a vácuo em membrana de acetato de celulose para retirada de qualquer impureza insolúvel e desaeração (USP, 2015).

### **3.2.3.3 Validação da metodologia analítica por espectrometria no UV e estudo do perfil de dissolução**

A validação da metodologia analítica foi realizada através dos ensaios de especificidade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão, robustez e estabilidade da amostra, exigidos pela ICH (Q2R1) e nos Procedimentos para Dissolução da USP (ICH, 2005; USP, 2015).

#### **3.2.3.3.1 Especificidade**

Esse parâmetro foi realizado no intuito de demonstrar que não existe interferência dos constituintes do placebo na análise (USP, 2015).

A solução do padrão foi diluída com o meio de dissolução para a concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup>. Os excipientes foram pesados de forma a equivalerem o conteúdo do comprimido de 5 mg de DAPA. Solução do padrão e excipientes foram adicionados cada qual em uma cuba, em triplicata, com rotação de 150 rpm. Alíquotas dessas

amostras foram retiradas aos 30 minutos de dissolução e as leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro. Uma varredura da solução contendo os excipientes (celulose microcristalina, lactose anidra, crospovidona, dióxido de sílcio, estearato de magnésio, álcool polivinílico, dióxido de titânio, macrogol, silicato de magnésio e óxido de ferro amarelo) também foi realizada.

Os resultados encontrados nas soluções padrões foram comparados aos das soluções de excipientes, seguindo a fórmula:

$$\text{Especificidade} = (A_p/A_{pd}) \times C_{pd} \times (V/P) \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Em que:

$A_p$  = é a absorbância do placebo,

$A_{pd}$  = é a absorbância do padrão;

$C_{pd}$  = é a concentração do padrão (mg/mL);

$V$  = é o volume do meio (mL);

$P$  = é o peso declarado (mg).

A interferência não pôde exceder 2% (FDA, 2015; USP, 2015).

### 3.2.3.3.2 Linearidade

A linearidade foi preparada a partir de três soluções padrões, diluídas em seis diferentes níveis, abrangendo a menor e a maior concentração que se esperava encontrar na liberação do fármaco durante a dissolução. Esse parâmetro foi calculado utilizando regressão linear (USP, 2015).

As três soluções padrões iniciais foram preparadas pesando-se 10 mg de DAPA, solubilizando-a em metanol, obtendo uma concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. As diluições foram realizadas com fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2 para às seguintes concentrações: 0,5, 1, 2, 5, 10 e 15 µg mL<sup>-1</sup>.

### 3.2.3.3.3 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados através da inclinação da curva e do desvio padrão obtido a partir das médias dos interceptos das curvas

feitas em triplicatas na avaliação da linearidade. Houve confirmação experimental dos valores encontrados (ICH, 2005).

#### **3.2.3.3.4 Precisão**

Analisada a partir da dissolução de seis comprimidos, a precisão foi determinada pelo cálculo do desvio-padrão das leituras das absorbâncias realizadas em espectrofotômetro UV-Vis em 224 nm. O ensaio deste parâmetro foi realizado com comprimidos de menores e maiores dosagens (5 e 10 mg, respectivamente) (USP, 2015).

A amostragem foi realizada aos 30 minutos, em apenas um único tempo por apresentar porcentagem de dissolução >85% em 20 minutos de ensaio (USP, 2015).

Esse parâmetro foi realizado em dias diferentes (interdias), bem como por outros analistas (entre analistas). O critério de aceite dos resultados foi de que as absorbâncias não excedessem 5% da leitura de um padrão na mesma concentração do esperado para a porcentagem de dissolução, sendo o DPR das absorbâncias menor do que 2% (USP, 2015).

#### **3.2.3.3.5 Exatidão**

O preparo das amostras para o ensaio da exatidão deu-se pela adição de solução padrão e excipientes a uma mesma cuba, de forma que representassem as concentrações de 80, 100 e 120% da concentração definida para a validação da metodologia, correspondente à 4,445, 5,556 e 6,667  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Utilizou-se um único de tempo de amostragem (30 minutos).

Os valores obtidos através das absorbâncias deveriam apresentar recuperação de 95 a 105% em relação a uma solução padrão na concentração definida para a validação (USP, 2015).

### 3.2.3.3.6 Robustez e estabilidade da amostra

A robustez é caracterizada como a resistência da metodologia analítica a pequenas alterações. É geralmente o último parâmetro a ser realizado. Para ser válido as variações não devem ser significativas ( $p > 0,05$ ) (USP, 2015).

Para a robustez na dissolução as pequenas modificações deram-se pela mudança no pH ( $1,20 \pm 0,2$ ), concentração de NaCl ( $2,00 \pm 0,10$ ) e volume do meio de dissolução ( $900 \pm 50$  mL). O tempo de amostragem foi aos 30 minutos. A partir das recomendações realizadas pelo novo guia do FDA partiu-se para uma abordagem sistemática utilizando um modelo para a seleção de pontos de design (Statistica<sup>®</sup> versão 8 do software), o Fatorial  $2^3$ . A ANOVA foi a ferramenta estatística escolhida para que se obtivesse resultados confiáveis frente aos intervalos de variações citados acima (FDA, 2015).

A estabilidade da amostra determina quão estável ela se apresenta frente a um maior tempo de dissolução. O tempo de alíquota inicial foi determinado por aquele cujo a amostra apresentou-se próxima de 100% do fármaco dissolvido, neste caso aos 30 minutos, e foi o fator de comparação para os resultados encontrados nas alíquotas retiradas após 2 horas e 30 minutos de dissolução. Para a conclusão deste parâmetro os valores devem apresentar-se entre 98 e 102% do teor encontrado na primeira amostragem.

### 3.2.3.4 Estudo do perfil de dissolução

O estudo do perfil de dissolução foi realizado com diferentes lotes de dapagliflozina 5 mg (A, B) e 10 mg (C, D, E), para fins de aplicação da metodologia desenvolvida e devidamente validada.

Os seguintes tempos de amostragem foram utilizados: 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 10 e 20 min. Estas amostras foram imediatamente filtradas em papel filtro quantitativo. Após a realização do perfil de dissolução as amostras foram quantificadas por espectroscopia UV-Vis em 224 nm.

Os perfis de dissolução obtidos foram analisados através da aplicação dos fatores  $f_1$  (fator de diferença) e  $f_2$  (fator de semelhança), fixando um dos lotes de cada dosagem (5 mg: A; 10 mg: D) e colocando o(s) outro(s) em comparação (BRASIL, 2010a).

A eficiência de dissolução (ED) também foi aplicada na análise comparativa dos perfis através do método de trapezoides. Este modelo avalia estatisticamente a equivalência dos testes de dissolução através da área sobre a curva obtida a partir das porcentagens de dissolução do fármaco em relação ao tempo (Khan e Rhodes, 1975). Os resultados foram analisados utilizando o teste t de Student para os dois lotes de DAPA 5 mg e ANOVA para os três lotes de DAPA 10 mg, com nível de significância de 0,05%.

$$ED = (ASC_{0-20}/ASC_{TR}) \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Em que:

$ASC_{0-20}$  = é a área sobre a curva de 0 a 20 minutos;

$ASC_{TR}$  = é a área total do retângulo (Khan e Rhodes, 1975).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização do estado sólido da matéria-prima

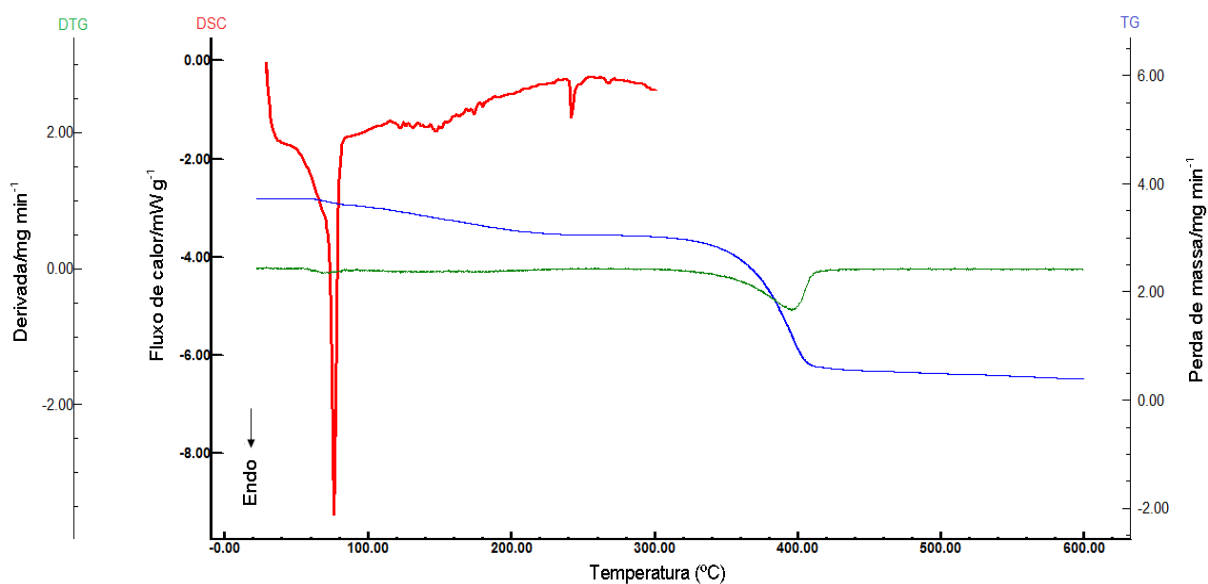
#### 4.1.1 Calorimetria Exploratória Diferencial

A curva de DSC da DAPA (figura 3) mostra dois eventos endotérmicos, um relativo ao ponto de fusão da molécula de propanodiol e também a água, registrado no certificado de compra da matéria-prima ( $T_{\text{peak1}} = 75,89^\circ \text{C}$ ;  $T_{\text{onset1}} = 72,07^\circ \text{C}$ ,  $\Delta H_{\text{fusion1}} = -114,91 \text{ J g}^{-1}$ ) e outro relativo ao ponto de fusão da dapagliflozina base ( $T_{\text{peak2}} = 242,14^\circ \text{C}$ ;  $T_{\text{onset2}} = 231,89^\circ \text{C}$ ,  $\Delta H_{\text{fusion2}} = -5,86 \text{ J g}^{-1}$ ), confirmado junto à uma base de dados (CHEMAXON, 2016).

#### 4.1.2 Análise Termogravimétrica

As curvas TG/DTG revelam a decomposição da dapagliflozina propanodiol em três eventos principais, um entre  $61,61\text{-}78,72^\circ \text{C}$  ( $\Delta m = 3,93\%$ , correspondendo a uma molécula de água), outro entre  $113,42\text{-}200,43^\circ \text{C}$  ( $\Delta m = 13,40\%$ , referente ao propanodiol) e um após os  $365^\circ \text{C}$ , relacionado a maior variação de massa frente a decomposição da DAPA ( $\Delta m = 65,82\%$ ), como mostra a Figura 3.

Figura 3: Curvas DSC e TG/DTG da dapagliflozina propanodiol.H<sub>2</sub>O.



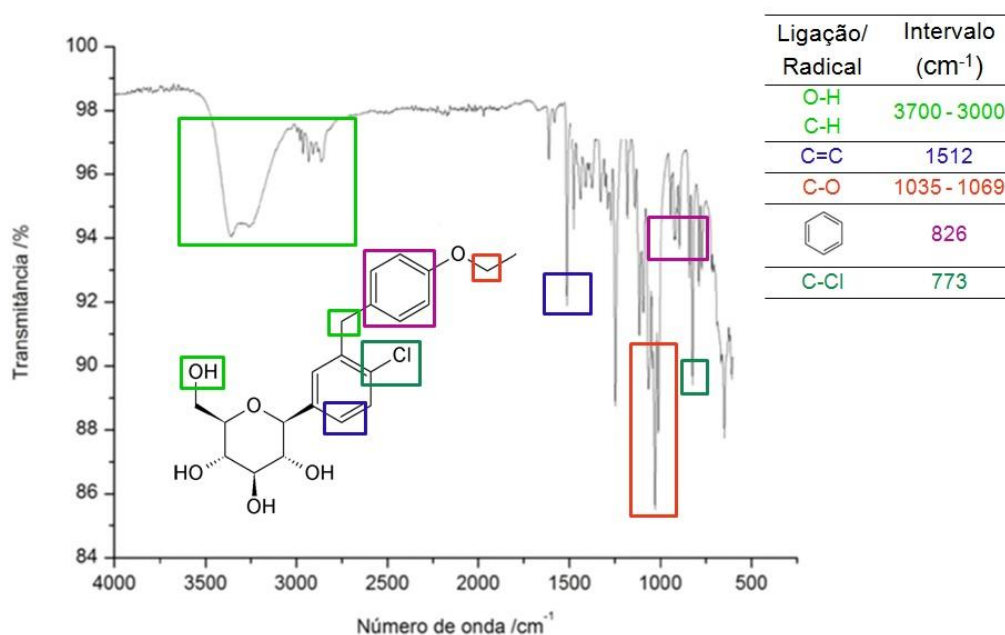
### 4.1.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

O espectro de absorção da dapagliflozina propanodiol matéria-prima revelou a presença de bandas largas no intervalo de 3700 a 3000  $\text{cm}^{-1}$  relacionadas às vibrações de estiramento da ligação O-H e C-H, esta última presente nos anéis aromáticos. As vibrações de estiramento das ligações C=C (presentes nos anéis aromáticos) geraram bandas em 1512  $\text{cm}^{-1}$ . As bandas observadas em 1035 e 1069  $\text{cm}^{-1}$  são referentes às ligações C-O, notadas nos grupamentos éter da molécula. Os benzenos presentes na molécula foram evidenciados em uma banda detectada em 826  $\text{cm}^{-1}$ , sendo a vibração de estiramento da ligação C-Cl foi encontrada em 773  $\text{cm}^{-1}$  (LOPES & FASCIO, 2004 YEASMIN et al., 2016).

O registro do espectro de absorção no infravermelho da dapagliflozina propanodiol foi realizado no intervalo de 4000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ , conforme mostra a Figura 4.

A reflexão difusa utilizada para determinar as informações espectrais da DAPA através da incidência e da reflexão de luz na amostra pode vir a apresentar resultados semelhantes aos obtidos pela técnica no infravermelho por transmissão utilizando KBr, e isso pode ocorrer devido ao caminho óptico no interior da matriz, que na maioria das vezes é aleatório devido às múltiplas reflexões (WETZEL, 1983).

Figura 4: Espectro FTIR da dapagliflozina.

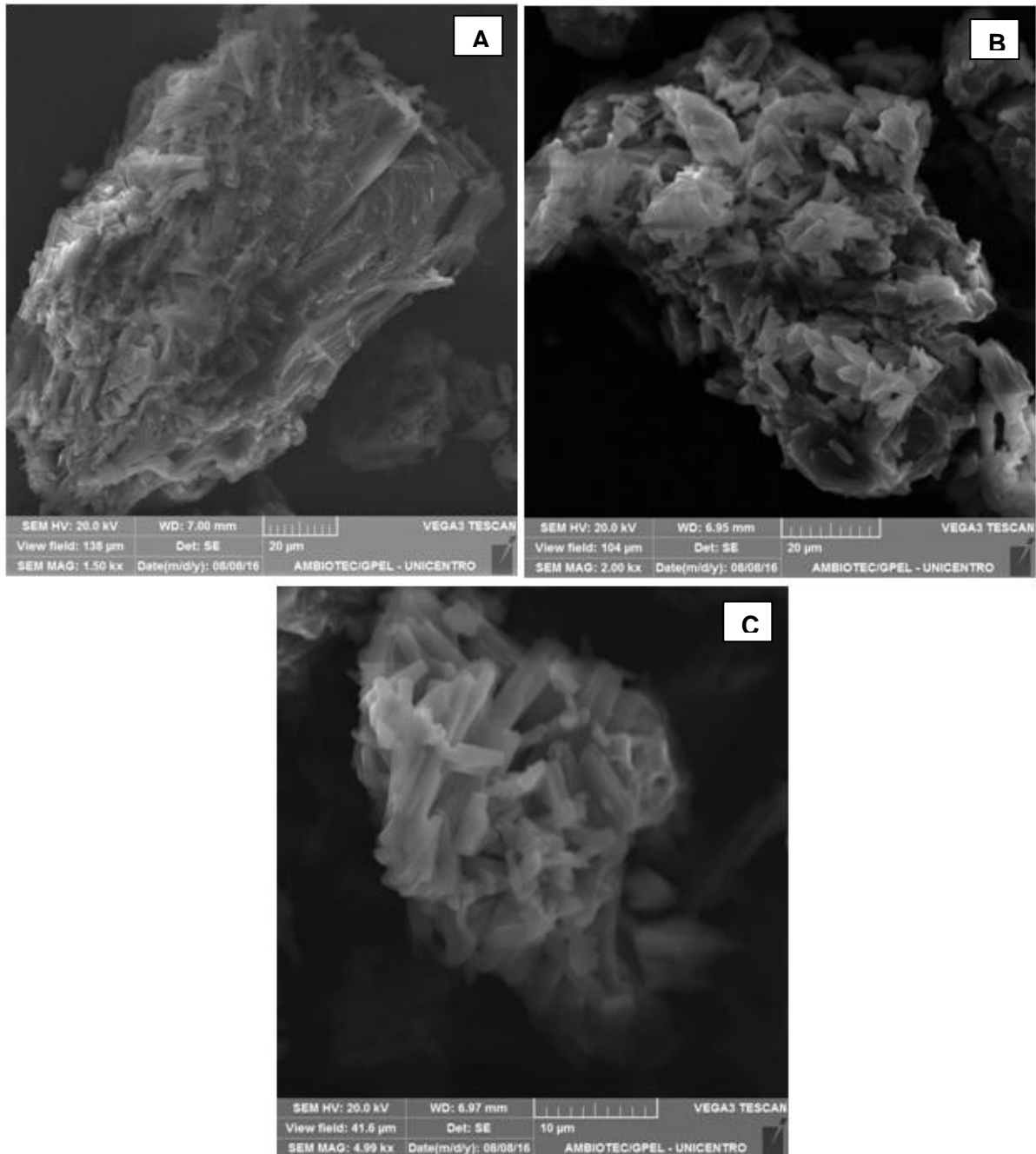


#### **4.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura**

As fotomicrografias da matéria-prima de dapagliflozina foram realizadas em quatro ampliações (1500x, 2000x e 5000x), conforme pode ser visualizado na Figura 5. A morfologia de dapagliflozina matéria-prima sugere estrutura cristalina.

Essa análise é de extrema importância para os ensaios em que a solubilidade é determinante, como por exemplo, no estudo do perfil de dissolução de diferentes lotes de um fármaco, cuja matéria-prima pode ser também de diferentes fabricantes e assim apresentar-se mais no estado amorfo do que cristalino e vice-versa, podendo levar a uma diferença de centenas de vezes de uma solubilidade para a outra, interferindo diretamente na biodisponibilidade do fármaco (HUANG & TONG, 2004).

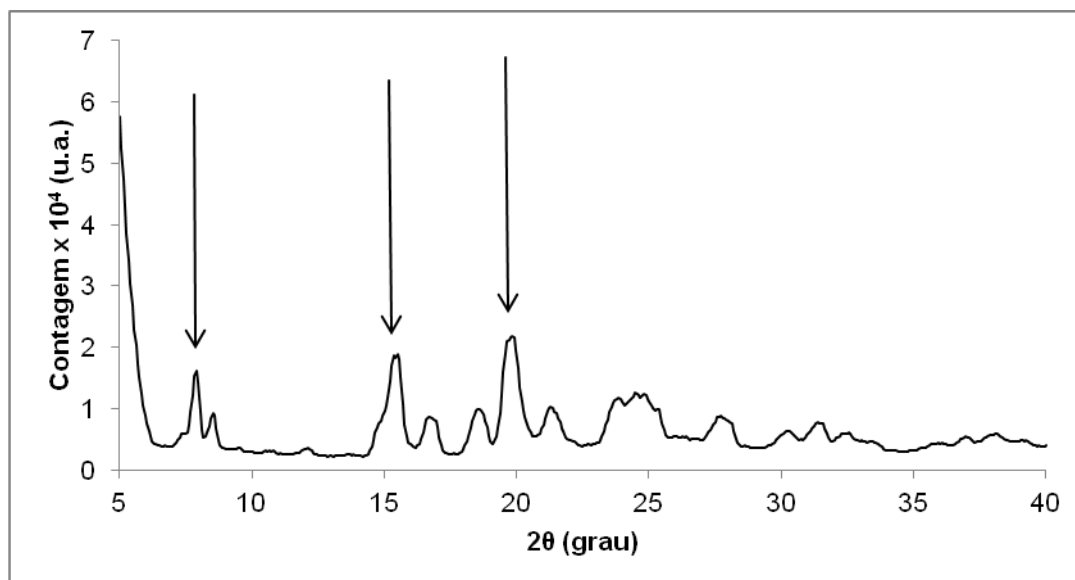
Figura 5: Micrografias de MEV: dapagliflozina (1500x) (A), (2000x) (B) e (5000x) (C).



#### 4.1.5 Difração de raio-X

Os picos de difração da dapagliflozina foram em  $7,90^\circ$ ,  $15,57^\circ$  e  $19,92^\circ$ , conforme indicados na Figura 6. A presença desses picos indica que a matéria-prima de dapagliflozina apresenta estrutura cristalina.

Figura 6: Perfil de difração de raios-X de pó da dapagliflozina.

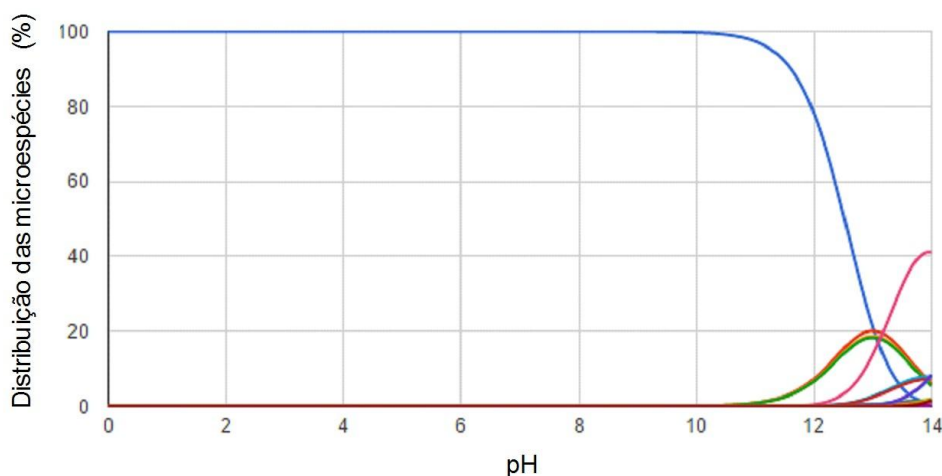


Essa técnica é essencial na identificação, controle e pureza de polimorfos, pois fármacos de iguais estruturas químicas podem apresentar-se morfologicamente diferentes, revelando assim propriedades físicas distintas que podem vir a interferir na biodisponibilidade do produto final. Portanto, os picos demonstrados na difração de raio-x para a matéria-prima utilizada no medicamento devem ser semelhantes quando houver troca de fabricantes durante sua produção, caso contrário haverá modificações em suas propriedades e novos ensaios deverão confirmar sua eficácia (STEPHENSON, 2005).

#### **4.2 Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de dapagliflozina e de seus produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

Como início do desenvolvimento da metodologia analítica para teor e produto de degradação por HPLC obteve-se dados de que o fármaco é pouco solúvel em água e apresenta um pKa acima de 12 (Figura 7). Fatos que levaram à utilização de solução orgânica para sua solubilização e fase móvel com pH próximo a 2 (OBERMEIER et al., 2010; CHEMAXON, 2016).

Figura 7: Microespécies de dapagliflozina e seus respectivos pHs.



(Adaptado de CHEMAXON, 2016).

Para a solubilização da DAPA utilizou-se metanol, sendo as diluições posteriores realizadas com as fases móveis testadas. A concentração inicialmente testada foi de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Nos ensaios para a escolha das colunas cromatográficas a área da DAPA, o tempo de retenção, bem como fator de cauda foram avaliados. Utilizando as colunas Synergi e Nova-Pak a DAPA apresentou áreas menores em relação às encontradas na Luna. O tempo de retenção encontrado na Synergi foi de 4,54 min e na Nova-Pak de 3,64 min, enquanto na Luna, 5,50 min. A pressão de ambas as colunas mantiveram-se constantes e os fatores de cauda estavam dentro das exigências (menores que 1,15) (ICH, 2005). A coluna Luna foi então escolhida para a continuidade dos testes.

No desenvolvimento deste método, corridas cromatográficas com o forno desligado também foram testadas, mas os resultados não foram considerados satisfatórios pela diminuição da área do princípio ativo, logo a temperatura do forno foi mantida a  $30^{\circ}\text{C}$ . Também, o controle de temperatura é desejável para evitar flutuações na qualidade analítica.

A continuidade dos testes deu-se com a escolha da acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (42:58, v/v) como fase móvel do método. Essa fase móvel apresentou áreas de DAPA maiores quando relacionada às demais fases móveis e também às diferentes proporções de ambas; tempos de retenção mais afastados do volume morto e como todas, pressão estável (84 kgf).

Além dos resultados serem mais satisfatórios na fase móvel escolhida, as fases móveis compostas por ácido fórmico estão entre as compatíveis com espectrômetro de massas, possibilitando a posterior utilização dessa metodologia analítica (LI et al., 2000).

#### **4.2.1 Condições cromatográficas definidas**

- Coluna cromatográfica de fase reversa Phenomenex® Luna C<sub>18</sub> (150 mm x 4,60 mm, 5 µm),
- Eluição isocrática,
- Vazão da fase móvel: 1 mL min<sup>-1</sup>,
- Composição da fase móvel: acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (42:58, v/v),
- Temperatura: 30 °C,
- Volume de injeção: 20 µL,
- Tempo de corrida: 6 minutos,
- Detector: DAD,

A fase móvel e os meios de dissolução foram previamente filtrados à vácuo e degaseificados por membrana acetato de celulose de poro 0,45 µm.

#### **4.2.2 Validação do método de quantificação e produtos de degradação por HPLC**

A metodologia desenvolvida e validada neste estudo tem a finalidade de determinar o teor de dapagliflozina e os seus produtos de degradação, enquanto a da literatura se destina apenas à determinação do fármaco. As fases móveis das metodologias diferenciam-se em relação ao ácido utilizado, esta ácido fórmico e a outra ácido ortofosfórico, e também em relação a proporção de acetonitrila utilizada (MANASA, et al., 2014).

A validação da metodologia de quantificação e produtos de degradação por HPLC atendeu a todas às exigências dos órgãos regulamentadores, subdivididos nos parâmetros abaixo (ICH, 2005).

#### 4.2.2.1 Especificidade e estudo de degradação forçada

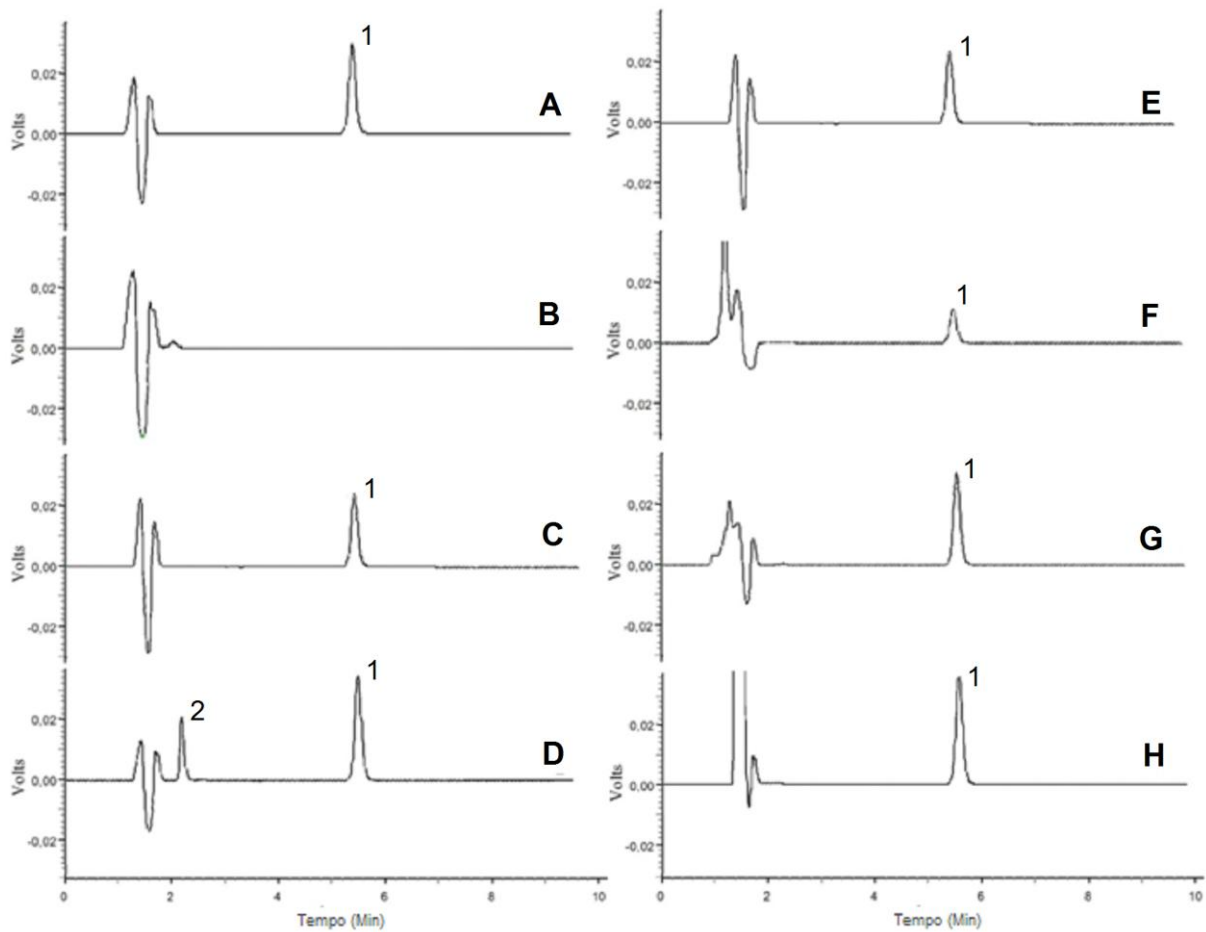
O método demonstrou ser específico, uma vez que em todas as condições de degradação o pico se mostrou puro, não havendo interferentes, ou seja, coeluição de picos secundários ao pico cromatográfico de DAPA, garantindo desta forma confiabilidade na quantificação e estudo indicativo de estabilidade.

O cromatograma B da Figura 8 demonstra através da análise da solução de excipientes (placebo) que os mesmos não interferem na análise.

No estudo de degradação forçada, realizado concomitantemente à especificidade, houve degradação na solução de DAPA exposta à luz UV. No cromatograma D, presente na Figura 8 é possível a visualização do pico de DAPA (1) aos 5,75 min e de seu produto de degradação (2) aos 2,33 min, com diminuição da área do ativo em 27,62% em relação ao padrão não levado a degradação (Cromatograma A, Figura 8). Uma possível estrutura para esse produto de degradação foi proposto.

Todas as demais condições de estresse não apresentaram redução significativa de sua área em relação ao padrão não levado a degradação, não apresentando nenhum outro possível produto de degradação (Figura 8).



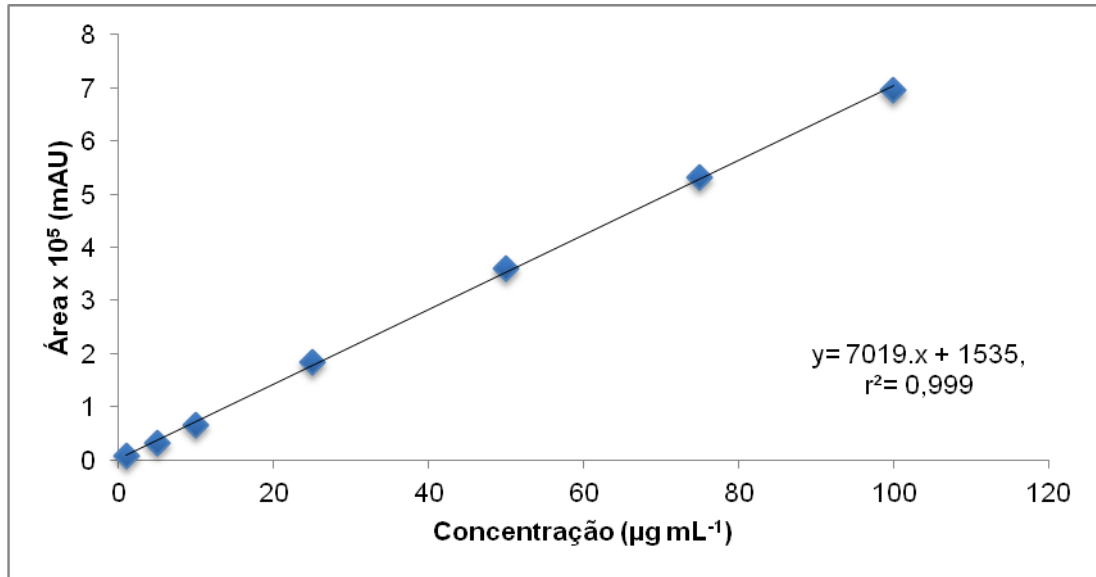
Figura 8: Cromatogramas de DAPA (50 µg mL<sup>-1</sup>).

(A) Pico da solução padrão de DAPA (1), (B) Solução placebo contendo os excipientes, (C) Fotodegradação (Luz do dia), (D) Fotodegradação (Luz UV) e Pico de produto de degradação (2), (E) Degradação térmica, (F) Hidrólise básica, (G) Hidrólise ácida, (H) Degradação oxidativa.

#### 4.2.2.2 Linearidade

A curva de calibração foi construída para determinar a faixa de linearidade do método (Figura 9). O método provou ser linear entre 1 e 100 µg mL<sup>-1</sup>, com coeficiente de determinação de  $r^2 = 0,999$  ( $y = 7019 \cdot x + 1535$ ; onde,  $y$  representa a área do pico absoluto e  $x$  a concentração). A ANOVA foi realizada, demonstrando regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ) e desvio da linearidade não significativo ( $p > 0,05$ ), validando este parâmetro.

Figura 9: Curva de Linearidade da dapagliflozina em HPLC.



#### 4.2.2.3 Limite de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação calculados foram de 0,09 e 0,28 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo confirmados experimentalmente.

Os limites encontrados neste método analítico foram menores do que os observados no único método para quantificação de DAPA presente na literatura, que foram de 0,60 µg mL<sup>-1</sup> para limite de detecção e 1,81 µg mL<sup>-1</sup> para quantificação, demonstrando que o método analisado neste trabalho é mais sensível do que o descrito por Manasa e colaboradores (MANASA et al., 2014).

#### 4.2.2.4 Precisão

No ensaio de repetibilidade, realizado com seis amostras igualmente preparadas, o DPR foi de 1,29%. Como pode ser observado na Tabela 1, na precisão interdia, representando três diferentes dias de análise, o DPR foi de 1,34% e na precisão entre analistas, de 1,41%.

O método mostrou-se preciso, com valores de DPR (<2%) enquadrados nas exigências feitas pelo ICH, e teores entre 95 a 105%, com média de 96,33% (ICH, 2005).

Tabela 1: Precisão interdia e entre analistas do método analítico para a determinação de DAPA e de seus produtos de degradação por HPLC.

Amostras	Interdia (n= 6)		Entre analistas (n=3)		
	Teor <sup>a</sup> (%)	DPR (%)	Analistas	Teor <sup>a</sup> (%)	DPR (%)
1	99,58 (± 0,25)				
2	95,79 (± 0,31)		A	98,49 (± 1,54)	
3	97,12 (± 1,02)	1,34	B	99,69 (± 0,69)	1,41
4	97,63 (± 1,34)		C	101,3 (± 0,87)	
5	97,60 (± 0,85)				
6	96,41 (± 1,29)				

<sup>a</sup>Referente a três replicatas

#### 4.2.2.5 Exatidão

O método demonstrou-se exato dentro do intervalo de interesse (40, 50 e 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , representando 80, 100, 120%, respectivamente) com recuperação do princípio ativo frente aos excipientes adicionados de 81,66, 100,47 e 119,35%, com DPR de 1,73, 1,88 e 1,19%, respectivos aos níveis de concentrações citados (Tabela 2). Os desvios apresentaram-se em acordo às exigências, todos menores que 2 (ICH, 2005).

Tabela 2: Exatidão do método analítico para a determinação de DAPA e de seus produtos de degradação por HPLC.

Análise	80% ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	100% ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	120% ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
1 <sup>o</sup>	41,60	50,70	59,33
2 <sup>o</sup>	40,21	49,15	59,21
3 <sup>o</sup>	40,83	50,86	59,68
DPR (%)	1,73	1,88	1,19
Recuperação (%)	81,66	100,47	119,35

#### 4.2.2.6 Robustez e estabilidade da amostra

O método foi considerado robusto através das análises de variações randomizadas fornecidas pelo desenho experimental tipo Box-Behnken, um modelo muito utilizado na otimização de métodos cromatográficos, bem como na compreensão dos fatores envolvidos nesse processo. Este é um modelo que utiliza valores de máximo e mínimo combinados junto ao ponto central. A ANOVA é então utilizada para a análise dos dados e validação do modelo. Tem sido umas das ferramentas de planejamento experimental amplamente incorporada em diversas áreas (FERREIRA et al., 2007, KARAGEOGOU & SAMANIDOU, 2014).

Não houve alterações significativas ( $p > 0,05$ ) em relação aos valores de fator de assimetria de pico e de teor encontrados com a realização da ANOVA. O modelo para ambos foi devidamente validado, com  $F_{\text{calc}} = 0,834 > F_{\text{tab}}$  para a primeira resposta e  $F_{\text{calc}} = 0,723 > F_{\text{tab}}$  para a segunda. Esses pontos nos trouxeram resultados satisfatórios de teor entre 99,31 e 101,95% (valores enquadrados na exigência de mais ou menos 2% do teor declarado da amostra analisada nas condições determinadas para a validação), e de assimetria de pico entre 1,02 e 1,14, cujos valores devem estar abaixo de 1,5. O aumento deste valor leva a uma maior assimetria de pico, e este método garante em determinados intervalos de variações que este problema não venha a ocorrer (DONG, 2006, NETO, 2009). Os dados estão contidos na Tabela 3.

Associado com os ensaios de robustez a amostra provou ser estável nas primeiras 48 h, apresentando 99,57% de teor e não ultrapassando o limite de 2% para mais ou para menos exigido para a conclusão de mais essa etapa (ICH, 2005).

Tabela 3: Condições cromatográficas randomizadas investigadas durante o ensaio de Robustez do método analítico para a determinação de DAPA e de seus produtos de degradação por HPLC com as respectivas respostas encontradas.

Experi mento	Fatores				Respostas <sup>a</sup>	
	Aceto nitrila (%)	Ác. Fórmico (%)	Fluxo (mL min <sup>-1</sup> )	Tempe ratura (°C)	Teor (%)	Assimetria de pico
0	42	0,10	1,0	30	101,82 (± 0,10)	1,07 (± 0,03)
1	44	0,09	1,0	35	100,92 (± 0,26)	1,11 (± 0,02)
2	42	0,11	1,1	25	99,47 (± 0,59)	1,09 (± 0,02)
3	42	0,09	1,1	35	100,85 (± 0,21)	1,13 (± 0,01)
4	40	0,11	0,9	35	101,95 (± 0,02)	1,11 (± 0,03)
5	42	0,11	1,1	35	101,38 (± 0,07)	1,09 (± 0,05)
6	40	0,09	1,0	25	100,33 (± 0,12)	1,11 (± 0,02)
7	40	0,10	0,9	25	101,29 (± 0,17)	1,10 (± 0,02)
8	40	0,09	0,9	30	100,72 (± 0,61)	1,10 (± 0,01)
9	40	0,10	1,1	25	99,97 (± 0,48)	1,10 (± 0,03)
10	44	0,10	0,9	25	101,07 (± 0,32)	1,06 (± 0,02)
11	44	0,11	0,9	30	101,71 (± 0,06)	1,03 (± 0,07)
12	42	0,09	1,1	25	100,67 (± 0,84)	1,02 (± 0,01)
13	40	0,11	1,0	35	101,33 (± 0,24)	1,13 (± 0,02)
14	44	0,09	1,0	30	101,24 (± 0,06)	1,12 (± 0,02)
15	40	0,10	0,9	35	99,31 (± 0,17)	1,09 (± 0,03)
16	42	0,09	0,9	25	99,57 (± 0,21)	1,14 (± 0,01)
17	44	0,09	1,0	25	100,80 (± 0,13)	1,12 (± 0,02)

<sup>a</sup>Referente a três injeções

O método foi aplicado com sucesso na quantificação de comprimidos contendo 5 e 10 mg, com teor médio ( $\pm$  DPR) de  $100,57 \pm 0,94\%$  (lote A) e  $99,72 \pm 0,82\%$  (lote B), para análise em triplicata de comprimidos contendo 5 mg de DAPA e  $99,35 \pm 1,56\%$  (lote C),  $98,77 \pm 1,08\%$  (lote D) e  $101,02 \pm 0,39\%$  (lote E), para análise em triplicata de comprimidos contendo 10 mg de DAPA, resultados dentro do intervalo exigido (98 a 102%) (ICH, 2005).

Resultados de teores dentro dos limites estabelecidos em uma análise de doseamento determinam que a metodologia encontra-se adequada para sua finalidade e assim, através de resultados confiáveis, que os fármacos em estudo revelam qualidade frente ao produto desenvolvido.

O doseamento foi realizado com o medicamento referência da dapagliflozina, o Foxiga<sup>®</sup>, pois como ainda apresenta-se em regime de patente, não há medicamentos genéricos e similares desse fármaco.

#### **4.3 Estudo dos produtos de degradação por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)**

O produto de degradação encontrado na solução exposta à luz UV por 24 horas foi analisado por UPLC-MS/MS e não por HPLC/MS pela razão de ser o UPLC acoplado ao MS, o equipamento disponível para esse feito. Esse produto de degradação apresentou massa molar de  $817,2780 \text{ g mol}^{-1}$  e apresentou-se como um possível dímero de DAPA, uma vez que sua massa molar é praticamente o dobro da massa molar encontrada para o padrão de DAPA.

No espectro obtido o produto de degradação é o pico majoritário (Figura 10) e seu tempo de retenção foi de 10 min, uma vez que algumas condições como volume de injeção e fluxo foram modificadas em função da utilização de um novo equipamento. Outro importante pico presente no espectro de massas faz referência à dapagliflozina associada com propanodiol, com massa molar de  $447,0980 \text{ g mol}^{-1}$ .

O mecanismo de reação proposto (Figura 11) para o surgimento desse produto de degradação consiste de uma substituição nucleofílica bimolecular ( $S_N2$ ) e ocorre através da alta excitação dos elétrons presentes na molécula provocadas pela luz UV, de forma a ocorrer protonação do oxigênio presente na estrutura cíclica. Com o

oxigênio protonado outra molécula ataca o centro eletrofílico da DAPA através de uma de suas hidroxilas, a de menor impedimento estérico, de forma a dimerizar e estabilizar a molécula. Subentende-se que haja liberação de  $H_2$ , e que a massa molar do possível dímero seja acrescida de  $H^+$  da ionização positiva do massas (CLAYDEN, GEEVES & WARREN, 2012).

Esse produto de degradação não está descrito na literatura. Somente há sua menção em um relatório apresentado por uma empresa responsável pela venda de matérias-primas (PHARMACODIA, 2016). Dessa forma, ainda deve ser qualificada quanto a sua segurança biológica, assim como rege o ICH, e limites para a concentração presente na formulação após os estudos de degradação forçada devem ser especificados (ICH, 2006; FDA, 2008).

Figura 10: Espectro de massas para identificação do produto de degradação de dapagliflozina por degradação fotolítica (luz UV) identificado em UPLC-MS/MS.

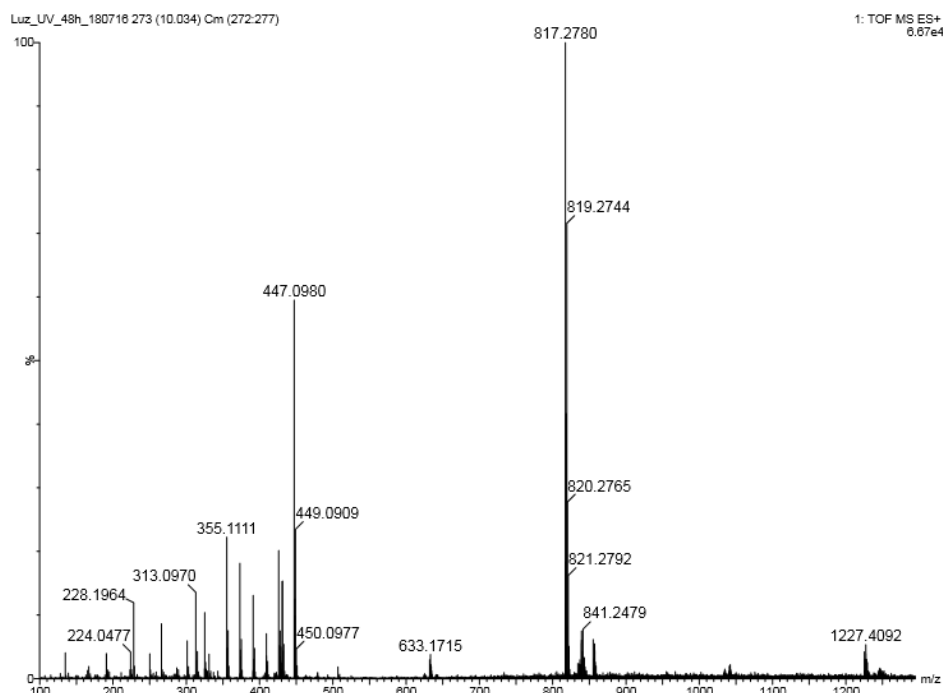
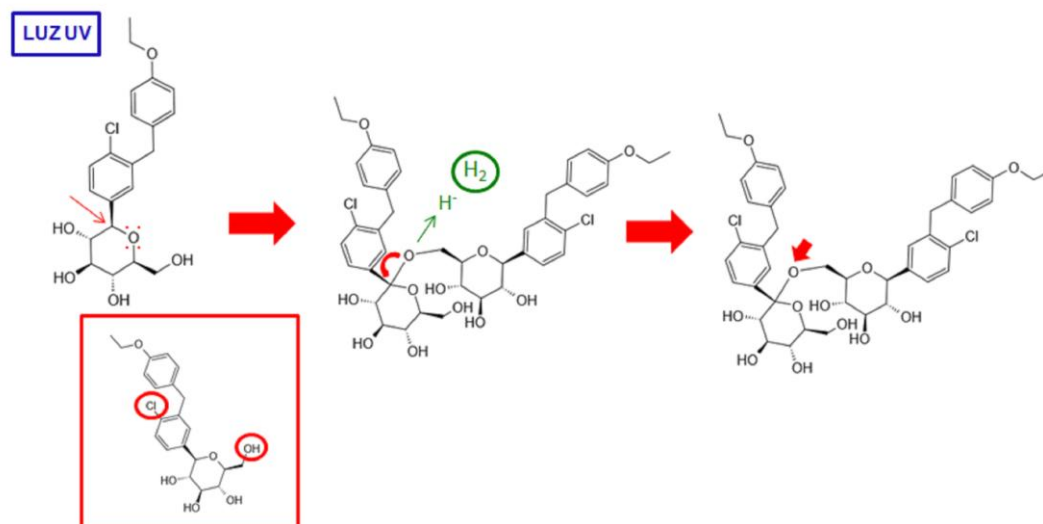




Figura 11: Mecanismo de reação proposto para surgimento do produto de degradação da dapagliflozina caracterizado por seu possível dímero, com massa molecular de 817,2780 g mol<sup>-1</sup>.



#### 4.4 Desenvolvimento da metodologia analítica de dissolução *in vitro*

O aparato utilizado nos testes foi a pá (Aparato II). Sua utilização é necessária quando os ensaios são realizados com comprimidos de liberação imediata (USP, 2015).

A prova de filtros não revelou interferência dos mesmos, como mostra a tabela 4 frente à leitura em UV realizada com o padrão de DAPA. A escolha dos filtros deu-se então, pelo economicamente mais vantajoso, o papel filtro quantitativo.

Tabela 4: Concentrações de DAPA em 30 minutos de dissolução para análise de interferência de filtro.

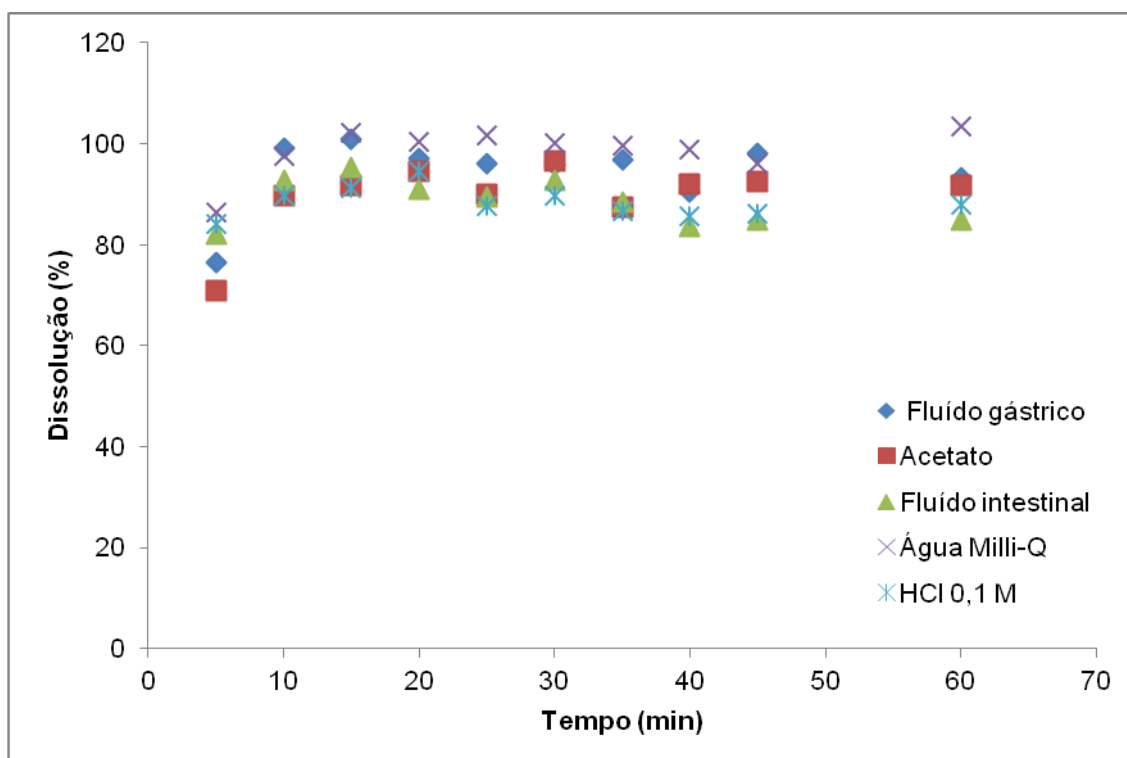
Filtros	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Teor (%)
Papel filtro quantitativo 28 $\mu\text{m}$	5,64	101,53 ( $\pm 0,16$ )
Filtro de seringa Full Flow 10 $\mu\text{m}$	5,51	99,23 ( $\pm 0,35$ )
Filtro de seringa Nylon 0,22 $\mu\text{m}$	5,49	98,85 ( $\pm 0,94$ )
Padrão de DAPA	5,56	100,00

A sequência dos ensaios foi dada pela escolha de um meio de dissolução que fornecesse melhores resultados em relação as porcentagem de dissolução em

velocidade pré-fixada de 50 rpm, à  $37 \pm 0,5$  °C em 900 mL. Para cada meio de dissolução preparou-se uma curva de calibração para que as leituras fossem realizadas em espectrofotômetro em 224 nm.

Dentre os meios analisados o fluido gástrico simulado foi o escolhido para que se desse a continuidade aos testes. Em menos de 10 minutos nesse meio, o fármaco já se apresentava quase que totalmente dissolvido, apresentado porcentagem de dissolução crescente dos 5 aos 15 minutos e assim mantendo-se constante até a última coleta (60 minutos) (Figura 12).

Figura 12: Perfil de dissolução da DAPA em diferentes meios à 50 rpm.



A água Milli-Q<sup>®</sup> também apresentou resultados satisfatórios, mas a sua qualidade e pH deveriam ser verificados e corrigidos, caso necessário, em todos os preparos para que não houvesse interferência do meio nos resultados. Mesmo ela estando presente em alguns compêndios oficiais, como na Farmacopeia Brasileira, os meios indicados para os ensaios pela USP são fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2, fluido intestinal simulado pH 6,8 e tampão acetato pH 4,5 (USP, 2015).

Os ensaios realizados com os demais meios de dissolução apresentaram porcentagens de dissolução mais baixas do que as que puderam ser vistas nos

testes com o fluido gástrico simulado e com a água Milli-Q<sup>®</sup>, mesmo assim, observou-se em geral que a DAPA teve alta taxa de dissolução em todos os experimentos.

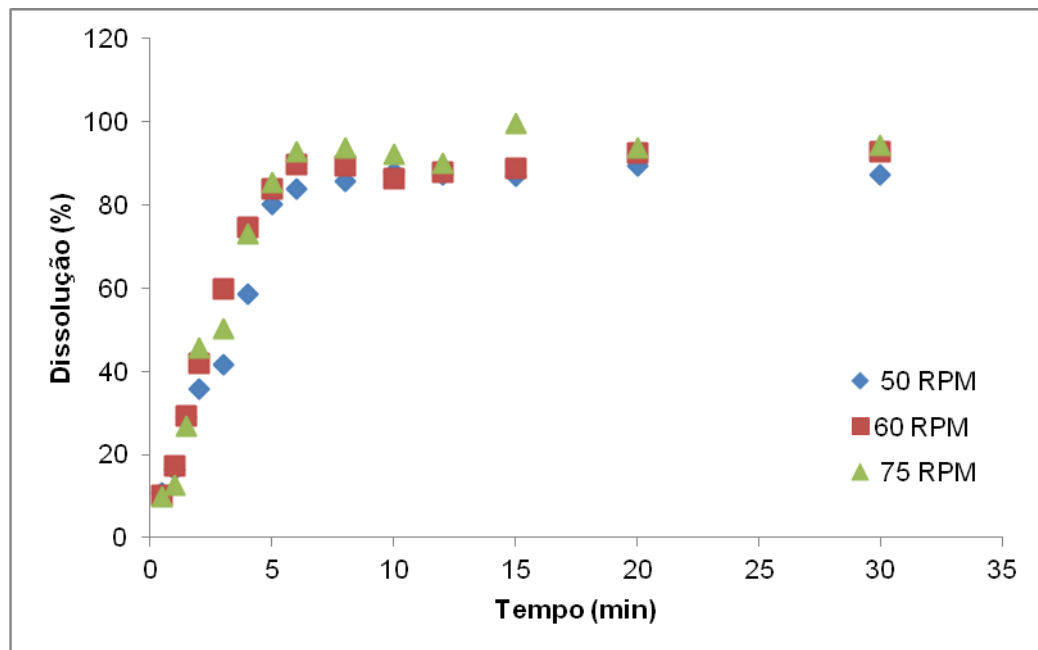
Os pHs de todos os meios foram registrados antes e depois do experimento, não apresentando alterações.

Com o meio de dissolução escolhido, passou-se para a análise da velocidade de agitação, inicialmente pré-fixada em 50 rpm, e testada também em 60 e 75 rpm. A recomendação da USP ao utilizar o Aparato II para a dissolução de comprimidos de liberação imediata é que a velocidade de agitação esteja entre 50 e 75 rpm (USP, 2015).

Como o comprimido de dapagliflozina apresentou rápida dissolução (em 20 minutos mais de 80% já se encontrava dissolvido) a menor rotação (50 rpm) apresentou maior poder discriminatório no início da dissolução e foi a escolhida (Figura 13). Para o fluido gástrico simulado as demais velocidades de agitação também apresentaram bons resultados de porcentagem de dissolução, comprovados através da análise estatística dos dados comparando a menor rotação com as demais velocidades estudada. Contudo, com uma rotação menor, também existe a vantagem de mais facilmente detectar-se qualquer desvio de qualidade na produção industrial. O fator de diferença foi de 9,80 para 60 rpm e 9,09 para 75 rpm, e o fator de semelhança foi de 52,75 para 60 rpm e 56,94 para 75 rpm, sempre em relação a velocidade de 50 rpm. Para que os perfis de dissolução sejam considerados iguais  $f_1$  deve ser menor que 15 e  $f_2$  maior que 50 (BRASIL, 2010a).

O método de dissolução divulgado pelo FDA difere-se do método desenvolvido neste trabalho na velocidade de dissolução, quantidade de meio e meio de dissolução selecionado, que foram respectivamente de 60 rpm, 1000 mL e tampão acetato pH 4,5 (FDA, 2015).

Figura 13: Porcentagem de dissolução em fluido gástrico simulado sem enzimas pH 1,2 em diferentes velocidades de agitação.



#### 4.4.1 Condições experimentais definidas

- Aparato e velocidade de agitação: Aparato II (pá) a 50 rpm;
- Meios de dissolução: fluido gástrico simulado sem enzimas (pH 1,2);
- Temperatura:  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ;
- Registro do pH no início e no final do experimento;
- Volume do meio: 900 mL;
- Leitura em UV,  $\lambda = 224 \text{ nm}$ .

#### 4.4.2 Validação da metodologia analítica por espectrometria no UV e estudo do perfil de dissolução

Os resultados obtidos no desenvolvimento da metodologia analítica de dissolução de DAPA demonstraram que esse fármaco possui ótima porcentagem de dissolução (>80% do fármaco dissolvido em 15 minutos de ensaio, à 50 rpm em fluido gástrico simulado). Esses resultados corroboram com os dados do SCB encontrados na literatura, sistema este que o classifica como um fármaco

representante da Classe 3, apresentando alta solubilidade e baixa permeabilidade (EMA, 2014).

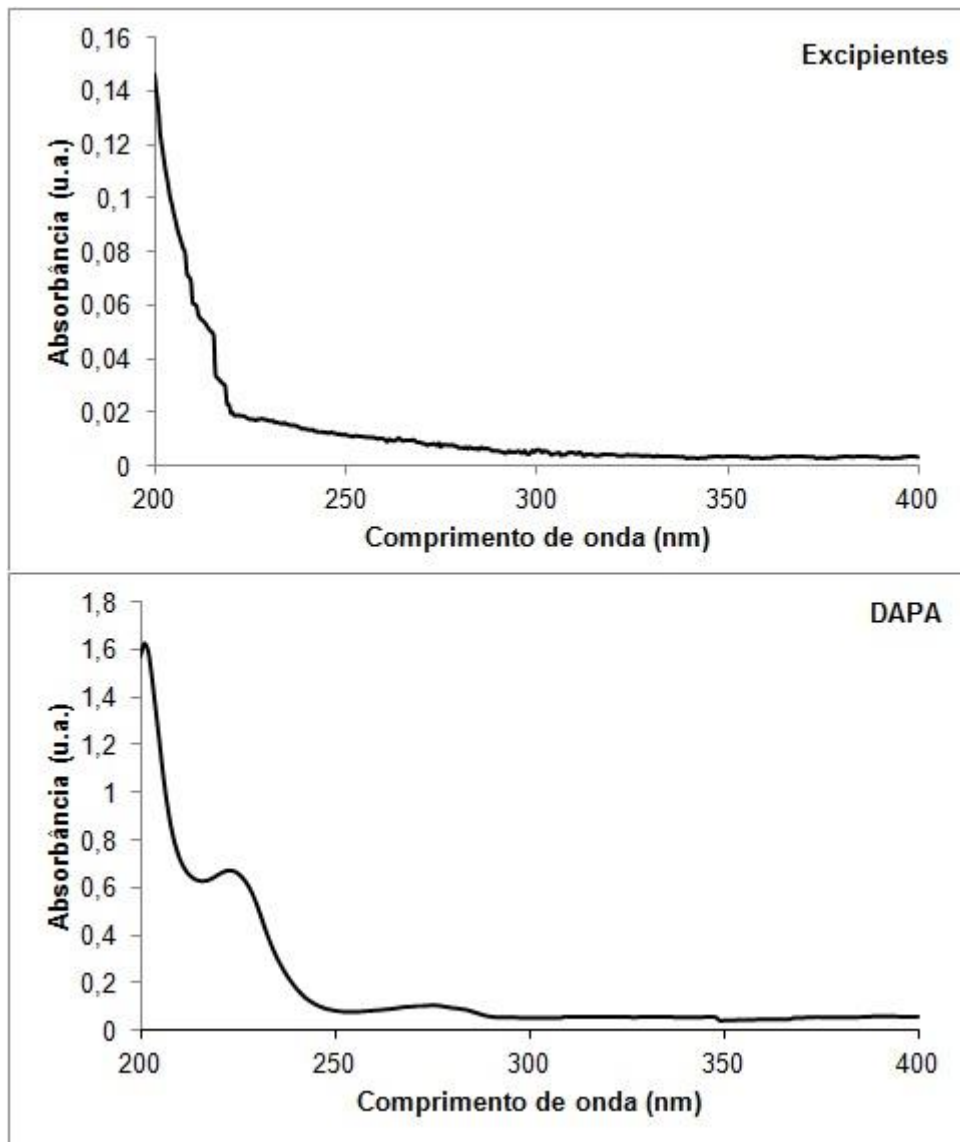
Os laudos dos fabricantes contrariam o exposto acima, e isso pôde ser confirmado experimentalmente quando 10 mg de DAPA pouco dissolveram-se em 10 mL de água, obtendo melhores resultados com sua completa solubilização em metanol. Essa diferença nos conceitos pode ter sido ocasionada pela forma com que os ensaios de solubilidade foram realizados. Segundo o FDA, para que um fármaco seja considerado altamente solúvel, a maior dose, 10 mg no caso da DAPA, deve solubilizar-se em volume igual ou inferior a 250 mL de meio aquoso, quantidade referente a administração oral junto a um copo de água (FDA, 2000; CHEMAXON, 2016).

No desenvolvimento as condições para os ensaios de dissolução foram definidas para que a metodologia pudesse ser validada. O Aparato II, com velocidade de agitação de 50 rpm, em 900 mL de fluído gástrico simulado pH 1,2 à  $37 \pm 0,5$  °C foram os parâmetros de escolha.

#### **4.4.2.1 Especificidade**

O método demonstrou especificidade ao não exceder o limite de 2% de interferência (1,81%) dos excipientes sobre as análises e também ao não demonstrar absorbância significativa na varredura por UV-Vis realizada na solução de excipientes em comparação com a varredura de DAPA (Figura 14).

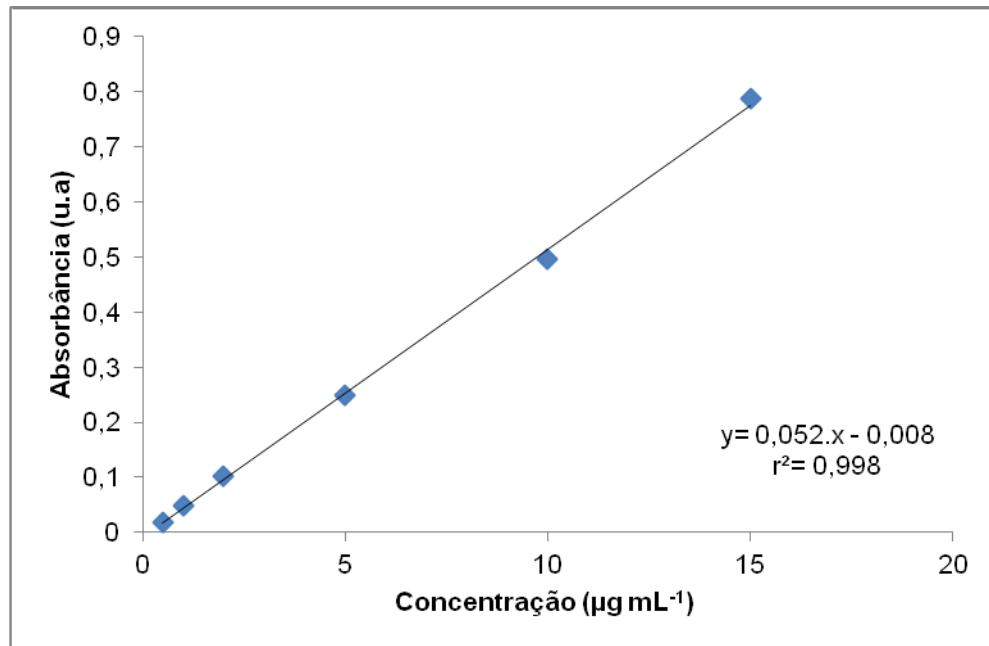
Figura 14: Varredura da solução de excipientes presentes no Forxiga<sup>®</sup> em comparação à varredura de DAPA.



#### 4.4.2.2 Linearidade

O método mostrou ser linear entre 0,5 e 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com coeficiente de determinação  $r^2 = 0,998$  ( $y = 0,052 \cdot x - 0,008$ ), onde, y é a leitura da absorbância de DAPA e x é a concentração), conforme pode ser visto na Figura 15. A análise de variância (ANOVA) foi realizada, demonstrando regressão linear significativa ( $p < 0,05$ ) e desvio de linearidade não significativa ( $p > 0,05$ ), validando o ensaio.

Figura 15: Curva de linearidade da dapagliflozina.



#### 4.4.2.3 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação calculados foram 0,05 e 0,15 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo os mesmos confirmados experimentalmente.

#### 4.4.2.4 Precisão

No ensaio que avalia a repetibilidade, a partir da dissolução de seis comprimidos de DAPA em iguais condições, o DPR para os comprimidos contendo 5 mg foi de 1,39% e para os contendo 10 mg de 0,67%, ambos apresentando teores com variação inferiores a 5% quando comparados a absorbâncias padrões (Abs= 0,261 e 0,437, respectivamente), como demonstrado na Tabela 5.

Tabela 5: Precisão indicativa da repetibilidade do método analítico de dissolução *in vitro* da dapagliflozina.

Repetibilidade (n= 6)		
	Comprimidos 5 mg	Comprimidos 5 mg
	Teor (%)	Teor (%)
	101,92	100,46
	101,15	100,92
	104,60	101,14
	101,15	100,92
	102,30	102,29
	103,83	101,83
DPR (%)	1,39	0,67

Para a precisão interdias, os ensaios de dissolução com as formulações farmacêuticas de menor e maior dosagem foram realizados em dois dias diferentes, com DPR de 0,11 e de 0,01% respectivamente, calculados entre as análises obtidas. A precisão entre analistas também foi realizada com ambas as dosagens, e o DPR obtido foi de 0,15% para os comprimidos de 5 mg e de 1,09% para os comprimidos de 10 mg.

O método mostrou-se preciso para as dosagens existentes no mercado, por apresentar os resultados em conformidade com o que é exigido pelos Compêndios Oficiais, como DPR abaixo de 2%. Os teores apresentaram-se com menos de 5% de diferença para mais e/ou para menos quando relacionados ao teor de uma absorbância padrão (USP, 2015).

#### 4.4.2.5 Exatidão

A metodologia analítica, através dos ensaios de recuperação, revelou-se exata. Os resultados obtidos mostraram o DPR dentro das especificações (<2%) e a recuperação com menos de 2% de diferença em relação ao percentual da leitura do padrão (0,261), conforme exige a Tabela 6 (USP, 2015).



Tabela 6: Exatidão do método analítico de dissolução *in vitro* da dapagliflozina.

Análise	80% (mg mL <sup>-1</sup> )	100% (µg mL <sup>-1</sup> )	120% (mg mL <sup>-1</sup> )
1º	4,51	5,52	6,69
2º	4,45	5,45	6,56
3º	4,50	5,45	6,67
DPR (%)	0,73	0,67	1,03
Recuperação (%)	80,72	98,47	119,41

#### 4.4.2.6 Robustez e estabilidade da amostra

A porcentagem de dissolução foi baseada na absorbância de um padrão de DAPA (0,261).

O Planejamento Experimental nos auxilia na avaliação de diversos fatores simultaneamente, como variações no pH, fluxo em métodos cromatográficos, temperatura, entre outros, e têm sido amplamente utilizado nos ensaios de robustez de métodos cromatográficos (DEJAGUER & HEYDEN, 2011).

O modelo escolhido para a análise da robustez neste método foi o Fatorial Completo, que permite a análise qualitativa e quantitativa, levando também à compreensão da interação entre os fatores determinantes no experimento. Os efeitos das interações nesse parâmetro são na maioria das vezes insignificantes, mas de extrema importância quando relacionado à otimização de um método (DEJAGUER & HEYDEN, 2007; DEJAGUER & HEYDEN, 2011).

Foram oito diferentes ensaios selecionados pelo Software (Statistica<sup>®</sup> versão 8), mais três ensaios de pontos centrais para a caracterização de um método robusto. O modelo foi então aprovado ( $F_{calc} = 2,11 > F_{tab}$ ) e na análise dos resultados feita pela ANOVA, não demonstrou valores significativos ( $p > 0,05$ ), o que permite levantar que a metodologia analítica se faz validada por também apresentar-se robusta (Tabela 7).

Tabela 7: Ensaio da robustez (análise Fatorial 2<sup>3</sup>) do método analítico de dissolução *in vitro* da dapagliflozina.

pH	NaCl (g)	Volume do meio (mL)	Concentração 30 min ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	% de dissolução 30 min
1,0	2,1	850	5,56	100,00
1,4	1,9	850	5,64	101,53
1,4	1,9	950	5,47	98,47
1,0	1,9	950	5,56	100,00
1,4	2,1	850	5,64	101,53
1,4	2,1	950	5,52	99,23
1,0	2,1	950	5,39	96,93
1,0	1,9	850	5,45	98,08
1,2	2,0	900	5,62	101,15
1,2	2,0	900	5,52	99,23
1,2	2,0	900	5,60	100,77

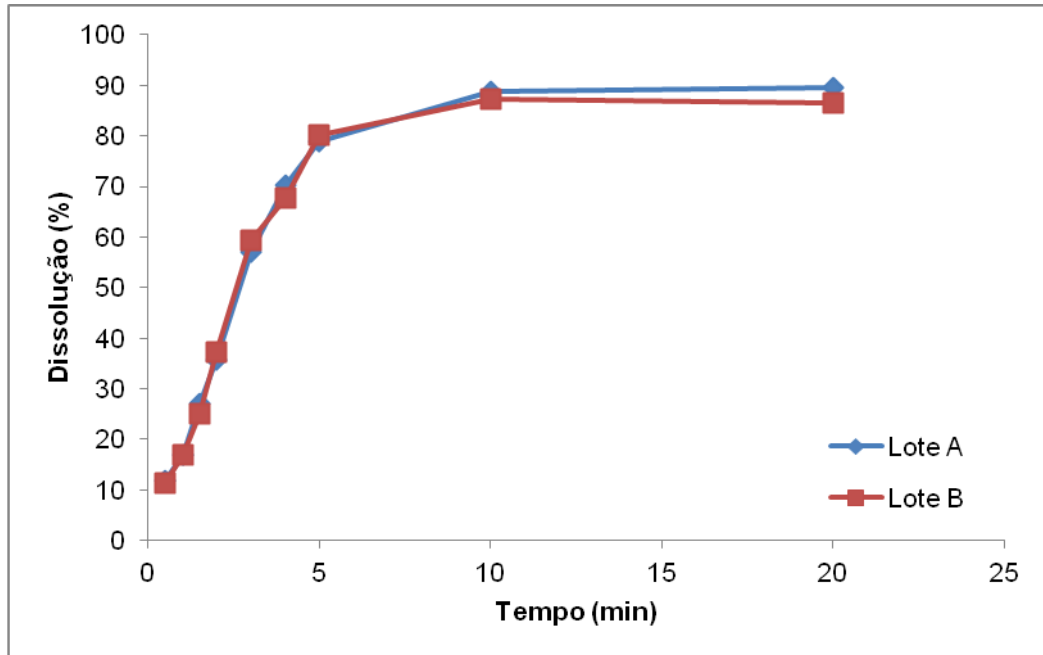
A estabilidade da amostra, com concentração de  $5,39 \mu\text{g mL}^{-1}$  na amostragem inicial e de  $5,47 \mu\text{g mL}^{-1}$  após 2 horas e 30 minutos de dissolução, foi determinada por um teor de 101,58%, estando dentro dos limites estabelecidos pela USP (USP, 2015).

#### 4.5 Estudo do perfil de dissolução

O estudo do perfil de dissolução foi realizado para demonstrar a aplicabilidade da metodologia validada. Através da análise estatística, que determina o fator de diferença e o fator semelhança, observou-se que o método pôde ser utilizado com sucesso para ambas as dosagens comerciais.

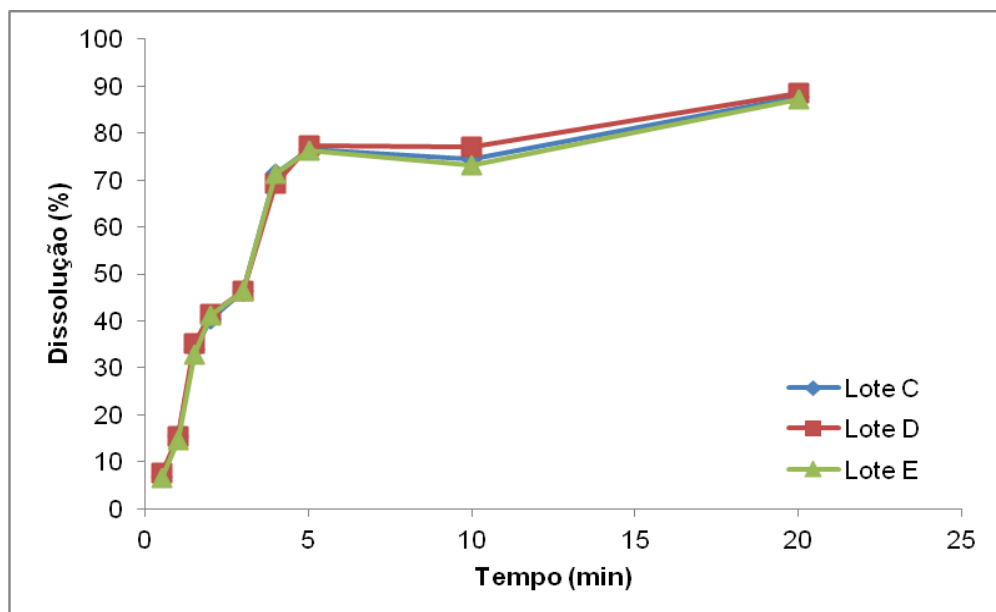
O lote A, referente aos comprimidos de 5 mg foi comparado ao lote B, também de 5 mg,  $f1$  inferior a 15 (1,92) e  $f2$  superior a 50 (87,52), determinando similaridade de comportamento entre eles (Figura 15).

Figura 16: Perfil de dissolução da DAPA 5 mg de dois diferentes lotes (Lotes: A, B).



Em relação aos comprimidos de 10 mg, o lote D quando comparado com o C apresentou  $f_1$  inferior a 15 (1,15) e  $f_2$  superior a 50 e bem próximo a 100 (93,41), e quando comparado ao lote E também apresentou  $f_1$  inferior a 15 (1,41) e  $f_2$  superior a 50 (91,63), confirmando que os lotes apresentam o mesmo comportamento de dissolução *in vitro* (Figura 16).

Figura 17: Perfil de Dissolução da DAPA 10 mg de três diferentes lotes (Lotes: C, D, E).



O estudo de ED para a análise comparativa dos perfis de dissolução também revelou similaridade entre eles, já que o teste t utilizado no tratamento dos dados para os lotes de DAPA 5 mg e a ANOVA para os lotes de 10 mg não demonstraram diferenças significativas entre as médias das eficiências de dissolução obtidas ( $p>0,05$ ), assim como pode ser observado na tabela 8.

Tabela 8: Eficiências de dissolução de diferentes lotes de DAPA 5 e 10 mg e seus tratamentos estatísticos.

Eficiências de dissolução (%)					
	DAPA 5 mg			DAPA 10 mg	
Cubas	A	B	C	D	E
1	75,72	75,33	69,93	71,07	69,70
2	77,55	75,04	70,13	71,60	69,51
3	76,56	76,01	70,39	71,63	69,32
4	75,88	76,08	70,60	69,96	71,10
5	76,67	76,19	70,46	70,95	70,69
6	76,57	76,03	70,77	70,29	71,18
Média	76,492	75,780	70,38	70,92	70,25
DP	0,653	0,474	0,31	0,68	0,84
DPR (%)	0,854	0,626	0,44	0,96	1,19
	Teste t $p=0,0561$			ANOVA $p=0,2007$	

Os perfis de dissolução da DAPA em suas duas diferentes dosagens foram visivelmente semelhantes, visto que em 20 min já haviam liberado mais de 80% do fármaco.

O ensaio dos perfis de dissolução e a análise comparativa entre eles comprovaram que o método analítico encontra-se apropriado para as análises de dissolução *in vitro* de DAPA, auxiliando nos ensaios que indicam a qualidade das formulações por ela compostas.

Os medicamentos analisados neste trabalho foram formulações referência, pois como já mencionado na avaliação da aplicabilidade da metodologia de quantificação e produto de degradação de DAPA, o produto inovador ainda encontra-se em regime de patente.

## 5 CONCLUSÕES

- A matéria-prima foi devidamente caracterizada.
- A metodologia para determinação de dapagliflozina e de seus produtos de degradação por HPLC em fase reversa foi desenvolvida e validada, demonstrando ser específica e linear no intervalo de 1 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo aplicado com sucesso no doseamento de lotes de 5 e 10 mg de dapagliflozina (Forxiga<sup>®</sup>).
- O estudo de degradação forçada revelou que a dapagliflozina é suscetível ao estresse fotolítico, precisamente por luz UV e um produto de degradação foi encontrado, com redução significativa da área do princípio ativo.
- O produto de degradação encontrado no estudo de degradação fotolítica foi analisado por UPLC-MS/MS e caracteriza-se como um possível dímero de dapagliflozina, com peso molecular de 817,2780  $\text{g mol}^{-1}$ , sem descrição completa na literatura.
- O método de dissolução *in vitro* foi validado com os seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, exatidão, precisão e robustez, bem como estabilidade da amostra. Essa metodologia pôde ser utilizada na análise do perfil de dissolução de diferentes lotes de dapagliflozina, comprovando a aplicabilidade do método.
- A partir dos métodos devidamente validados, pode-se ressaltar a importância do desenvolvimento e da validação de metodologias analíticas aplicadas à fármacos não só do ponto de vista regulatório, mas também e principalmente, quanto a segurança e a qualidade do produto farmacêutico, no intuito de podermos confiar no que a indústria farmacêutica diz estar produzindo.
- Os métodos desenvolvidos podem servir para um desenvolvimento de monografia farmacopeica para análise de dapagliflozina.

## 6 REFERÊNCIAS

ALBARRAN, O.; BLASCO, F.. Dapagliflozina, el Primer Inhibidor SGLT 2 en el Tratamiento de la Diabetes Tipo 2. **Medicina Clinica**. v. 141, p. 36-43, 2013.

AHMED, L.A.; JOAKIMSEN, R.M.; BERNRSEN, G.K.; FONNEBO, V.; SCHIMER, H.. Diabetes *mellitus* and the Risk of Non-vertebral Fractures: the Tromso Study. **Osteoporos Int**. v. 17, p. 495-500, 2006.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (ADA). Diagnosis and Classification of Diabetes *mellitus*. **Diabetes Care**. v. 36, p. S67–74, 2013.

BALAKUMAR, P.; SUNDARAM, K.; DHANARAJ, S.. Dapagliflozin: Glucuretic Action and Beyond. **Pharmacological Research**. v. 82, p. 34-39, 2014.

BERNARDI, L.S.; OLIVEIRA, P.R.; MURAKAMI, F.S.; SILVA, M.A.S.; BORGMANN, S.H.M.; CARDOSO, S.G.. Characterization of Venlafaxine Hydrochloride and Compatibility Studies with Pharmaceutical Excipients. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 97, p. 729–733, 2009.

BLESSY, M.; PATEL, R.D.; PRAJAPATI, P.N.; AGRAWAL, Y.K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**. v. 4, n. 3, p. 159-165, 2014.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC Nº 45, de 09 de agosto de 2012. **Dispõe sobre a Realização dos Estudos de Estabilidade de insumos Farmacêuticos Ativos**. Brasília, DF, 2012.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC Nº 31, de 11 de agosto de 2010a. **Dispõe sobre a Realização dos Estudos de Equivalência Farmacêutica e de Perfil de Dissolução Comparativo**. Brasília, DF, 2010.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC Nº 37, de 3 de agosto de 2011. **Dispõe sobre o Guia para Isenção e Substituição de Estudos de Biodisponibilidade Relativa/Bioequivalência e dá outras Providências**. Brasília, DF, 2011.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC Nº 58, de 10 de outubro de 2014. **Dispõe sobre as Medidas a Serem Adotadas Junto à Anvisa pelos Titulares de Registro de Medicamentos para a Intercambialidade de Medicamentos Similares com o Medicamento de Referência**. Brasília, DF, 2014.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RDC Nº 58, de 20 de dezembro de 2013. **Estabelece 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, e dá outras Providências.** Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2013.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RE Nº. 899, de 29 de maio de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos.** Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2003.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). RE Nº. 310, de 01 de maio de 2004. **Guia para realização do estudo e elaboração do relatório de equivalência farmacêutica e perfil de dissolução.** Brasília: Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2004.

BRASIL. BRISTOL-MYERS SQUIBB. **Anvisa Aprova Novo Medicamento para o Tratamento do Diabetes Tipo 2 que Funciona de Forma Independente da Insulina.** Disponível em: <[http://www.bristol.com.br/Sala-de-Imprensa/release/detalhe\\_release/13-07-23/Anvisa\\_aprova\\_novo\\_medicamento\\_para\\_tratamento\\_do\\_diabetes\\_tipo\\_2\\_que\\_funciona\\_de\\_forma\\_independente\\_da\\_insulina.aspx](http://www.bristol.com.br/Sala-de-Imprensa/release/detalhe_release/13-07-23/Anvisa_aprova_novo_medicamento_para_tratamento_do_diabetes_tipo_2_que_funciona_de_forma_independente_da_insulina.aspx)>. Acesso em: 14 Abr. 2015.

BRASIL. FARMACOPÉIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Análise Térmica**, 5ª ed. Brasília, 2010b, v.1, p 146.

BRASIL. FARMACOPEIA BRASILEIRA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Teste de Dissolução**, 2010c. v. 1, p. 66-73.

CHADHA, R.; ARORA, P.; BHANDARI, S.; GARG, M.; JAIN, D.V.S.. Thermoanalytical and Spectroscopic Studies on Different Crystal Forms of Nevirapine. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 111, p. 2133-2142, 2013.

CHADHA, R.; BHANDARI, S.. Drug-excipient Compatibility Screening - Role of Thermoanalytical and Spectroscopic Techniques. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 87, p. 82– 97, 2014.

CHEMICALIZE By ChemAxon. **Properties Viewer Dapagliflozin**. Disponível em: <<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Dapagliflozin>>. Acesso em: 08 Dez. 2015.

CHEMAXON. **Physico-Chemical Property Predictors**. Disponível em: <<https://www.chemaxon.com/products/calculator-plugins/property-predictors/#pka>>. Acesso em: 07 Fev. 2016.

CHOWDARY, K.P.R.; RAJYALAKSHMI, Y. Dissolution Rate in Modern Pharmacy. **East Pharm**. v.30, n.350, p.51-54, 1987.

CLAYDEN, J.; GEEVES, N.; WARREN, S. **Organic Chemistry**. 2 ed. Reino Unido, Oxford University Press, 2012, p. 405-443.

CUFFINI, S.; JÚNIOR, A.P.; TOMBARI, D.. Polimorfismo em Fármacos. In: STORPIRTIS, S.; GONÇALVES, J.E.; CHIANN, C.; GAI, M.N. (eds.) **Biofarmacotécnica**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, p. 21-31.

DEJAEGUER, B.; HEYDEN, Y.V.. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 56, p. 141-158, 2011.

DEJAEGUER, B.; HEYDEN, Y.V.. Ruggedness and robustness testing. **Journal of Chromatography A**. v. 1158, p. 138-157, 2007.

DICKEN, A.; SHEVCHUK, A.; ROGERS, K.; GODBER, S.; EVANS, P.. High Energy Transmission Annular Beam X-Ray Diffraction. **Optics Express**. v. 23, p. 6304-6312, 2015.

DING, Y.; EZEKOYE, O.; LU, S.; WANG, C. Thermal Degradation of Beech Wood with Thermogravimetry/Fourier Transform Infrared Analysis. **Energy Conversion and Management**. v. 120, p. 370–377, 2016.

DONG, M. W.. Modern HPLC for practicing scientists. **Wiley Interscience**, Massachusetts, p. 24-36, 2006.

DUARTE, L.; JUCHEM, P.; PULZ, G.; BRUM, T.; CHODUR, N.; LICCARDO, A.; FISHER, A.; ACAUAN, R.. Aplicações de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Sistema de Energia Dispersiva (EDS) no Estudo de Gemas: Exemplos Brasileiros. **Pesquisas em Geociências**. v. 30, p. 3-15, 2003.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (EMA). **Assessment Report Forxiga, Procedure Nº. EMEA/H/C/002322**, 2012. Disponível em: <[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Public\\_assessment\\_report/human/002322/WC500136024.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002322/WC500136024.pdf)>. Acesso em: 14 Jul. 2015.

FERREIRA, S.L.C.; BRUNS, R.E.; SILVA, E.G.P.; SANTOS, W.N.L.; QUINTELLA, C.M.; DAVID, J.M.; ANDRADE, J.B.; BREITKRETZ, M.C.; JARDIM, I.C.S.F.; NETO, B.B.. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**. v. 1158, p. 2-14, 2007.

FIGUEIREDO, R.; SNOEK, F.; BARRETO, S.. Do Patients And Physicians Agree on Diabetes Management? A Study in Public Healthcare Centres in Brazil. **Patient Education and Counseling**. v. 92, p. 107–113, 2013.

FILHA, F.; NOGUEIRA, L.; MEDINA, M.. Avaliação do Controle de Hipertensão e Diabetes na Atenção Básica: Perspectiva de Profissionais e Usuários. **Saúde Debate**. v. 38, p. 265-278, 2014.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Dissolution Methods: Dapagliflozina. Linha 306, 28/05/2015**. Disponível em: <[http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp\\_getallData.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_getallData.cfm)>. Acesso em: 08 Fev. 2016.



FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Dissolution Testing and Specification Criteria for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Containing Biopharmaceutics Classification System Class 1 and 3 Drugs - Guidance for Industry**, 2015. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM456594.pdf>>. Acesso em: 12 Abr. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **FDA Approves Farxiga® to Treat Type 2 Diabetes**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm380829>>. Acesso em: 14 Abr. 2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry: Analytical Procedures and Methods for Validation Drugs and Biologics**, 2015. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm386366.pdf>>. Acesso em 10 Jan. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry: Q3A Impurities in New Drug Substances**, 2008. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073385.pdf>> Acesso em 23 Fev. 2016.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry: waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms base on a biopharmaceutics classification system**, 2000. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070246.pdf>>. Acesso em 07 Nov. 2016.

FUENTE, J. L.; BERMEJO, M.R.; SALVÁN, C. M.; ESTEBAN, S.O.. Thermal characterization of HCN Polymers by TG-MS, TG, DTA and DSC Methods. **Polymer Degradation and Stability**. v. 96, p. 943-948, 2011.

GALMIER, M.J.; BOUCHON, B.; MADELMONT, J.C.; MERCIER, F.; PILOTAZ, P.; LARTIGUE, C.. Identification of Degradation Products of Diclofenac by Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry. **Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 38, p. 790-796, 2005.

GIRON, D.. Applications of Thermal Analysis and Coupled Techniques in Pharmaceutical Industry. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. vol. 68, p. 335-357, 2002.

HE, F.; YI, W.; BAI, X.. Investigation on Caloric Requirement of Biomass Pyrolysis Using TG-DSC Analyzer. **Energy Conversion and Management**. v. 47, p. 2461-2469, 2006.

HILFIKER, R.. Polymorphism in the Pharmaceutical Industry. **Whilet-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA**. p. 14-17. Weinheim, Germany, 2006.

HUANG, L.F.; TONG, W.Q.. Impact of solid state properties on developability assessment of drug candidates. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 56, p. 321-334, 2004.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Harmonized Tripartite Guideline: Impurities in new drug products Q3B (R2)**, 2006. Disponível em:

<[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q3B\\_R2/Step4/Q3B\\_R2\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3B_R2/Step4/Q3B_R2__Guideline.pdf)>. Acesso em: 22 Mar. 2016.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Harmonized Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1)**, 2005. Disponível em:

<[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf)>. Acesso em: 25 Mar. 2016.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH). **Specifications: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances. In: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use Q6A**, 1999. Disponível em: <[http://ichguideline.weebly.com/uploads/2/6/2/1/26210522/q6a\\_step4.pdf](http://ichguideline.weebly.com/uploads/2/6/2/1/26210522/q6a_step4.pdf)>. Acesso em: 23 Mar. 2016.

JAIN, D.; KUMAR P.. Forced Degradation and Impurity Profiling: Recent Trends in 2 Analytical Perspectives. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 86, p. 11-35, 2013.

KARAGEOGOU, E.; SAMANIDOU, V.. Youden Test Application in Robustness Assays During Method Validation. **Journal of Chromatography A**. v. 1353, p. 131-139, 2014.

KASICHAYANULA, S.; LIU, X.; ZHANG, W.; PFISTER, M.; REELE, S.B., AUBRY, A.F.; LACRETA, F.P.; BOULTON, D.W.. Effect of a High-fat Meal on the Pharmacokinetics of Dapagliflozin, a Selective SGLT2 Inhibitor, in Healthy Subjects. **Diabetes, Obesity and Metabolism**. v.13, p. 770–773, 2011.

KHAN, K.A., RHODES, C.T.. The Concept of Dissolution Efficiency. **Journal Pharmacy and Pharmacology**. v. 27, p. 48-49, 1975.

KUMARASAMY, K.; NA, J.; YANG, J.; YANG, E.. Numerical Techniques to Model Conduction Dominant Phase Change Systems: A CFD Approach and Validation with DSC Curve. **Energy and Buildings**. v. 118, p. 240-248, 2016.

LI, W., ROSSO, D.T., FOUNTAIN, S.T.. Development and Validation of a Semi-automated Method for L-dopa and Dopamine in Rat Plasma Using Electrospray LC/MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 24, p. 325–333, 2000.

LI, Z.; WANG, X.; XU, X.; QUIU, Q.; JIAO, L.; HUANGM W.; QUIAN, H.. Design, Synthesis and in vivo Evaluation of Novel C-Aryl Glucosides as Potent Sodium-Dependent Glucose Cotransporters Inhibitors for the Treatment of Diabetes. **Chemical Biology Drug Design**. v. 86, p. 764-775, 2015.

LOPES, W.A.; FASCIO, M.. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**. v. 27, p. 670-673, 2004.

MANADAS, R.; PINA, M.E.; VEIGA, F.. A Dissolução *in vitro* na Previsão da Absorção Oral de Fármacos em Formas Farmacêuticas de Liberação Modificada. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, n. 4, 2002.

MANASA, S.; DHANALAKSHMI, K.; NAGARJUNA, R.; SREENIVASA, S.. Development and Validation of stability-Indicating RP-HPLC method for determination of Dapagliflozin, **Journal of Advanced Pharmacy Education and Research**. v. 4, p. 350-353, 2014a.

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 Sciences and Drug Research**. v. 6, n. 3, p. 250-252, 2014b.

MARANGUI, M.; CARNOVALE, A.; DURANTE, C.; TARQUINI, G.; TISEO, G.; FILETTI, S.. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Clinical Efficacy of Dapagliflozin for the Treatment of Type 2 Diabetes. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**. v. 11, p. 1, 2014.

MARCOLONGO, R. Dissolução de Medicamentos: Fundamentos, Aplicações, Aspectos Regulatórios e Perspectiva na Área Farmacêutica. 2003. 117p. **Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2003.

MARTIN, F; RODIGUEZ, F.. Inhibidores de la Reabsorción Renal de Glucosa: Una Nueva Opción Terapéutica ara el Tratamiento de la Diabetes. **Avances em Diabetología**. v. 26, p. 448-450, 2010.

MENG, W.; ELLSWORTH, B.; NIRSCHL, A. MCCANN, P.; PATEL, M.; GIROTRA R., WU, G. 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, p. 1145-1149, 2008.

MOHAMMAD, Y., GOWRI D.S.. 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 Pharmaceutical and Clinical Research**. v. 8, p. 320-326, 2015.

NETO, A. Problemas com o formato dos picos em cromatografia líquida. *Scientia Chromatographica*. v.1, n. 3, p. 69-77, 2009.

OBERMEIER, M.; YAO, M.; KHANNA, A.; KOPLOWITZ, B.; ZHU, M.; LI, W. KOMOROSKI, B.; KASICHAYANULA, S.; DISCENZA, L.; WASHBURN, W.; MENG, W.; ELLSWORTH, B.A.; WHALEY, J.M.; HUMPHREYS, W.G.. *In vitro* Characterization and Pharmacokinetics of Dapagliflozin (BMS-512148), a Potent Sodium-Glucose Cotransporter type II Inhibitor, in Animals and Humans. **Drug Metabolism Disposition**. v. 38, n. 3, p. 405-414, 2010.

PELUSI, A.; HANAWA, Y.; ARAIE, H.; SUZUKI, I.; GIORDANO, M.; SHIRAIWA, Y.. Rapid Detection and Quantification of Haptophyte Alkenones by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). **Algal Research**. v. 19, p. 48-56, 2016.

PHADNIS, N.V.; CAVATUR, R.K.; SURYANARAYANAN, R.. Identification of Drugs in Pharmaceutical Dosage Forms by X-Ray Powder Diffractometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.15, p.929-943, 1997.

PHARMACODIA. **Dapagliflozin Propanediol Monohydrate**. disponível em: <[http://www.pharmacodia.com/web/productDetails/getProductDetails?productId=230&locale=pt\\_BR](http://www.pharmacodia.com/web/productDetails/getProductDetails?productId=230&locale=pt_BR)>. Acesso em: 29 Jul. 2016.

RIBEIRO, A.; SILVA, C.; ROCHA, G.; PEREIRA, M.; ROCHA, A.. Diabetes Gestacional: Determinação de Fatores de Risco para o Diabetes *mellitus*. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**. v. 10, p. 8-13, 2014.

ROUMELI, E.; TSIAPRANTA, A.; PAVLIDOU, E.; VOURLIAS, G.; KACHRIMANIS, K.; BIKIARIS, D.; CHRISAFIS, K.. Compatibility Study Between Trandolapril and Natural Excipients Used in Solid Dosage Forms. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 111, p. 2109-2115, 2013.

SANAGAPATI, M.; DHANALAKSHMI, K.; NAGARJUNA, G.; SREENIVASA, S.. Method Development and Validation of Dapagliflozin API by UV Spectroscopy. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**. v. 27, p. 270-272, 2014.

SANTOS, E.; TEIXEIRA, C.; ZANETTI, M.; SANTOS, M.. A Efetivação dos Direitos dos Usuários de Saúde com Diabetes *mellitus*: Co-Responsabilidades entre Poder Público, Profissionais de Saúde e Usuários. **Texto Contexto Enfermagem**. v. 2, p. 461-470, 2011.

SEO, Y.; HAHM, J.; KIM, T.; CHOI, W.. Factors Affecting Fatigue in Patients with Type II Diabetes *mellitus* in Korea. **Asian Nursing Research**. v. xxx, p. 1-5, 2015.

SHABIR, G.A.. Validation of High-performance Liquid Chromatography Methods for Pharmaceutical Analysis Understanding the Differences and Similarities Between Validation Requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**. v. 987, p. 57-66, 2003.

SINGH, R. HPLC method development and validation - an overview. **Journal of Pharmaceutical Education and Research**. v. 4, n. 1, 2013.

SILVA, E. C. PAOLA, M.V.R.V.; MATOS, J. R.. Análise Térmica Aplicada à Cosmetologia. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 43, n. 3, 2007.

SOCIEDADE PORTUGUESA DE DIABETOLOGIA (SPD). Observatório Nacional da Diabetes: Diabetes: Fatos e Números 2013. **Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes**. Disponível em: <[http://spd.pt/images/prova\\_final\\_od2013.pdf](http://spd.pt/images/prova_final_od2013.pdf)>. Acesso em: 16 Abr. 2015.

STEPHENSON, G.A. Applications of x-ray powder diffraction in the pharmaceutical industry. **The Rigaku Journal**, v. 22, n. 1, p. 2-15, 2005.

STRENG, W. H.. Physical Chemical Characterization of Drug Substances. **Research Focus**. v. 2, nº. 10, 1997.

TORRE, E.; TEJEDOR, L.; MENÉNDEZ, S.; CORTÉS, M.; GARCÍA, Á.; DOMINGO, M.; SOLANS, J.; GUIASOLA, F.; ALEGRÍA, J.; BRAVO, J.; SANTOS, C.; GONZÁLEZ, R.. Recomendaciones para el Tratamiento Farmacológico de la Hiperglucemia en la Diabetes Tipo 2. **Avances En Diabetología**. v. 26, p. 331-338, 2010.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, 2001. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>>. Acesso em: 25 Mar. 2016.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP) 38 NACIONAL FORMULARY 33. **Dissolution**, General Chapter 711, 2015.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP) 38 NACIONAL FORMULARY 33. **The Dissolution Procedure: Development and Validation**, General Chapter 1092, 2015.

WETZEL, D.L.. Near-infrared reflectance analysis sleeper among spectroscopic techniques. **Analytical Chemistry**. v. 55, p. 1165A-1176A, 1983.

WHITE, J.. Sodium Glucose Cotransporter 2 Inhibitors. **Medical Clinics of North America**. v. 99, p. 131-143, 2015.

WRIGHT, E.. Renal Na<sup>+</sup> - Glucose Cotransporters. **American Journal Physiology-Renal**. v. 280, p. 10-18, 2001.

YEASMIN, S.; SINGH, B.; JOHNSTON, C.T.; SPARKS, D.. Evaluation of pre-treatment procedures for improved interpretation of mid infrared spectra of soil organic matter. **Geoderma**, periódico eletrônico. <http://dx.doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.04.008>, 2016.