

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**INVESTIGAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL POR LC-MS/MS
E RMN ¹H DE IMPUREZAS DESCONHECIDAS DE RAMIPRIL
PELLET GERADAS EM ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA**

Leonardo Piccoli Medinilha*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

Orientador(a): Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho

***Empresa: Libbs Farmacêutica Ltda.**

**São Carlos - SP
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Leonardo Piccoli Medinilha, realizada em 27/07/2018.

Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho
UFSCar

Profa. Dra. Tanare Cambrão Ribeiro Ferreira
Libbs

Prof. Dr. Eli Fernando Pimenta
UFSCar

Dedico este trabalho ao meu amor, Ariane, por toda a paciência e apoio durante os dias difíceis;

Aos meu pais e irmão, por todo o amor incondicional recebido;

A todos os meus amigos, especialmente ao Lucas e Bastardo, por terem despertado em mim o sentimento máximo de amizade e amor ao próximo.

“If we're so much the same like I always hear, why such different fortunes and fates?” Rush

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Edinho, meu orientador, pela disponibilidade, paciência e sábios conselhos durante minha trilha nesta caminhada.

À Libbs Farmacêutica, pela oportunidade ímpar, disponibilidade de materiais e recursos, fazendo com que este trabalho fosse possível. Em especial à Michele, Olga e Lucas, pelo auxílio e contribuição intelectual.

Aos meus colegas de trabalho Tanare, Mônica e Diana pelo incentivo e apoio desde o início do projeto.

À todo o corpo técnico administrativo do Departamento de Química da UFSCar, pelo suporte oferecido.

Agradeço também aos professores Edenir e Quézia pelos ensinamentos e principalmente por me fazerem obter uma nova visão sobre Química Analítica e Ciências das Separações.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- λ – Comprimento de onda (*lambda*)
- ACN – Acetonitrila
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- API – *Active pharmaceutical ingredient*
- BP – *British Pharmacopoeia*
- CDI – Centro de Desenvolvimento Integrado
- COSY – *Homonuclear correlation spectroscopy*
- CP – Consulta Pública
- DAD – Detector de arranjo de diodos
- ECA – Enzima conversora da angiotensina I
- EP – *European Pharmacopoeia*
- FDA – *United States Food and Drug Administration*
- GRMED – Gerência de Avaliação de Tecnologia de Registro de Medicamentos Sintéticos
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*)
- HSQC – *Heteronuclear single quantum coherence*
- ICH – *International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*
- IFA – Insumo farmacêutico ativo
- LC – Cromatografia líquida (*Liquid Chromatography*)
- MS – Espectrometria de massas (*Mass Spectrometry*)
- NMR – *Nuclear magnetic resonance*
- ODS – Octadecilsilano
- PVDF – Fluoreto de polivinilideno
- RE – Resolução
- RDC – Resolução da Diretoria Colegiada
- R.H. – *Relative humidity*
- RMN – Ressonância magnética nuclear
- SPE – Extração em fase sólida (*solid phase extraction*)
- UFSCar – Universidade Federal de São Carlos
- U.R. – Umidade relativa
- USP – *United States Pharmacopeia*
- UV – Ultra-violeta
- XIC – *Extracted ion chromatogram*

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Representação esquemática de um (a) Pellet de IFA + excipientes e (b) Pellet inerte com IFA revestido superficialmente.....	6
FIGURA 1.2. Estrutura molecular do ramipril e seu metabólito ativo ramiprilato.....	7
FIGURA 1.3. Distribuição de cargas e valores de pKa para o ramipril.....	8
FIGURA 1.4. Distribuição de microespécies de ramipril de acordo com o pH.....	8
FIGURA 1.5. Grupos funcionais do ramipril susceptíveis à degradação.....	9
FIGURA 1.6. Impurezas farmacopeicas do ramipril.....	9
FIGURA 1.7. Cromatograma experimental do estresse térmico e úmido (70°C, 75%U.R. por 6 horas) de ramipril pellet. Método interno FE MA 830720.....	10
FIGURA 4.1. Cinética de formação das impurezas desconhecidas a 70°C, 75% U.R. em 24 horas.....	20
FIGURA 4.2. Cinética de formação da impureza E a 70°C, 75% U.R. em 24 horas.....	21
FIGURA 4.3. Comparação entre o método FE MA 830720 (em azul) e o proposto para LC-MS/MS (em vermelho). Detecção por UV a 220nm.....	22
FIGURA 4.4. Sobreposição dos cromatogramas UV 220 nm da amostra inicial de ramipril pellet (em vermelho) e da amostra estressada a 70°C, 75% U.R por 6 horas (em azul)...	22
FIGURA 4.5. Espectros de massas, no modo negativo, obtidos para o (a) ramipril, o (b) pico em 36,4 minutos e o (c) pico em 35,5 minutos..	23
FIGURA 4.6. Espectros de massas, no modo positivo, obtidos para o (a) ramipril, o (b) pico em 36,4 minutos e o (c) pico em 35,5 minutos.....	23
FIGURA 4.7. Cromatograma XIC da massa 711Da (modo negativo) da amostra de ramipril pellet estressada.....	24
FIGURA 4.8. Cromatograma XIC da massa 713Da (modo positivo) da amostra de ramipril pellet estressada.....	24
FIGURA 4.9. Padrão de fragmentação da molécula ramipril obtido no experimento Product Ion.....	25
FIGURA 4.10. Proposta apresentada para a fragmentação do IFA ramipril.....	26
FIGURA 4.11. Padrão de fragmentação obtido para o (a) pico em 36,4 minutos e para o (b) pico em 35,5 minutos.....	27
FIGURA 4.12. Comparação dos cromatogramas XIC em 711Da (modo negativo) de ramipril pellet (em azul), ramipril puro (em vermelho) e placebo de pellets (em verde) estressadas a 70°C, 75% U.R. por 6 horas.....	28
FIGURA 4.13. Espectro de absorção UV do ramipril.....	28
FIGURA 4.14. Espectro de absorção UV da impureza com tempo de retenção de 35,5 minutos.....	29
FIGURA 4.15. Espectro de absorção UV da impureza com tempo de retenção de 36,4 minutos.....	29
FIGURA 4.16. Regiões de eletrofilicidade e nucleofilicidade presentes no ramipril.....	30
FIGURA 4.17. Estrutura molecular da sacarose e seus álcoois primários em destaque... 30	
FIGURA 4.18. Estruturas geradas por reação de transesterificação entre uma molécula de ramipril e uma molécula de sacarose com (a) reação no sacarídeo glicose e (b) (c) reação no sacarídeo frutose.....	31
FIGURA 4.19. Reação geral de transesterificação.....	31
FIGURA 4.20. Proposta apresentada para a fragmentação das impurezas desconhecidas – ligação ocorrendo no sacarídeo frutose (representação da ligação sem estereoquímica).32	

FIGURA 4.21. Cromatograma XIC da massa 711Da (modo negativo) da amostra de ramipril pellet estressada (destaque para os picos minoritários em 35,38, 36,04 e 38,30 minutos).....	33
FIGURA 4.22. Padrão de fragmentação obtido para o (a) pico em 35,38 minutos, para o (b) pico em 36,04 minutos e para o (c) pico em 38,30 minutos..	33
FIGURA 4.23. Cromatograma UV (220nm) evidenciando os picos 1 e 2 separados no modo “time slice” .	35
FIGURA 4.24. Cromatograma UV (220nm) evidenciando os picos 1 e 2 separados no modo “time slice” – Ampliação 1.....	35
FIGURA 4.25. Espectro de RMN de ¹ H para o pico 1 – b1 em CD ₃ OD.....	36
FIGURA 4.26. Espectros de RMN de ¹ H para os picos 1 – b1 (inferior) e 2 – b2 (superior) em CD ₃ OD.....	37
FIGURA 4.27. Espectros de RMN de ¹ H para os picos 1 – b1 (inferior) e 2 – b2 (superior) em CD ₃ OD. Ampliação – Parte 1.....	37
FIGURA 4.28. Espectros de RMN de ¹ H para os picos 1 – b1 (inferior) e 2 – b2 (superior) em CD ₃ OD. Ampliação – Parte 2.....	38
FIGURA 4.29. Espectros de RMN de ¹ H para os picos 1 – b1 (inferior) e 2 – b2 (superior) em CD ₃ OD. Ampliação – Parte 3.....	38
FIGURA 4.30. Espectros de RMN de ¹ H para os picos 1 – b1 (inferior) e 2 – b2 (superior) em CD ₃ OD. Ampliação – Parte 4.....	39
FIGURA 4.31. Mapa de contorno HSQC para o pico 1 – b1 em CD ₃ OD – Ampliação 1... 40	40
FIGURA 4.32. Mapa de contorno HSQC para o pico 1 – b1 em CD ₃ OD – Ampliação 2... 40	40
FIGURA 4.33. Mapa de contorno HSQC para o pico 1 – b1 em CD ₃ OD – Ampliação 3... 41	41
FIGURA 4.34. Mapa de contorno HSQC para o pico 2 – b2 em CD ₃ OD – Ampliação 1... 41	41
FIGURA 4.35. Mapa de contorno HSQC para o pico 2 – b2 em CD ₃ OD – Ampliação 2... 42	42
FIGURA 4.36. Mapa de contorno HSQC para o pico 2 – b2 em CD ₃ OD – Ampliação 3... 42	42
FIGURA 4.37. Espectro de ¹³ C de sacarose e mapas de contorno HQSC (região ampliada das Figuras 4.31 e 4.34) das impurezas.....	43
FIGURA 4.38. Mapa de contorno DOSY para o pico 2 – b2 em CD ₃ OD.....	44
FIGURA 4.39. Avaliação de mutagenicidade (Derek e Sarah) e classificação segundo ICH M7.	45
FIGURA 4.40. Avaliação de mutagenicidade – Proposta de estrutura 1.	45
FIGURA 4.41. Avaliação de mutagenicidade – Proposta de estrutura 2.	46
FIGURA 4.42. Avaliação de mutagenicidade – Proposta de estrutura 3.	46
FIGURA 4.43. Definição das estratégias de controle baseadas na avaliação de mutagenicidade.	47
FIGURA 4.44. Contribuições principais para absorção UV.	48

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1. Cálculo dos limites de notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em fármacos.	5
TABELA 1.2. Composição dos pellets de ramipril.	10
TABELA 3.1. Condições cromatográficas empregadas no método analítico #1.....	14
TABELA 3.2. Gradiente de eluição empregado no método analítico #1.....	15
TABELA 3.3. Condições cromatográficas empregadas no método analítico #2.....	16
TABELA 3.4. Gradiente de eluição empregado no método analítico #2.....	16
TABELA 3.5. Parâmetros de ionização da fonte electrospray.	16
TABELA 3.6. Condições cromatográficas empregadas no método analítico #3.....	17
TABELA 3.7. Gradiente de eluição empregado no método analítico #3.....	17
TABELA 4.1. Cálculo de desvio de massa para as impurezas desconhecidas.	34
TABELA 4.2. Tempos de coleta dos picos de impurezas separados no modo "time slice".	36

RESUMO

INVESTIGAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL POR LC-MS/MS E RMN ¹H DE IMPUREZAS DESCONHECIDAS DE RAMIPRIL PELLET GERADAS EM ESTUDO DE DEGRADAÇÃO FORÇADA. O desenvolvimento de um produto farmacêutico compreende etapas multidisciplinares, indo desde estudos de compatibilidade entre o insumo farmacêutico ativo (IFA) e as demais matérias-primas (excipientes) a estudos de degradação forçada com o medicamento final (produto acabado), dentre outros. Estudos de degradação forçada compreendem uma gama de ensaios que visam expor o medicamento a diferentes condições de estresse, a fim de se verificar tanto a estabilidade química do IFA quanto a formação de produtos de degradação (também conhecidos como impurezas). O controle da formação de impurezas, sejam elas advindas do processo ou formadas durante a vida de prateleira (*shelf life*) do produto são de suma importância, pois podem comprometer a saúde do paciente e impactar tratamentos em andamento. O entendimento prévio da formulação viabiliza todo o ciclo de vida de um produto farmacêutico, uma vez que a reprovação de lotes produtivos ou lotes em comercialização podem trazer prejuízos aos fabricantes e risco aos pacientes. Foi verificado que, sob condições de estresse térmico e úmido, o princípio ativo ramipril, apresentado sob forma de *pellets* (micro-esferas de sacarose e amido de milho) sofre reações de degradação gerando impurezas acima do limite de especificação previsto em legislação para impurezas desconhecidas. Uma vez que esta condição pode ser correlacionada às condições de estabilidade prevista em legislação (30°C e 75% de umidade relativa por 24 meses), existe um risco para o produto ao término do estudo. Desta forma, o presente trabalho teve como foco a elucidação estrutural de duas impurezas utilizando-se das técnicas de espectrometria de massas com fragmentação sequencial e ressonância magnética nuclear. Foi possível identificar as estruturas químicas das impurezas majoritárias de maneira conclusiva, verificando-se tratar de uma reação de transesterificação entre o álcool primário do monômero de frutose da sacarose (em suas duas formas anoméricas) proveniente dos pellets e o ramipril.

ABSTRACT

INVESTIGATION AND STRUCTURAL ELUCIDATION BY LC-MS/MS AND NMR ^1H OF RAMIPRIL PELLET'S UNKNOWN IMPURITIES GENERATED BY FORCED DEGRADATION. The development of a pharmaceutical product comprises multidisciplinary steps, coming from compatibility studies between the active pharmaceutical ingredient (API) and the other raw material (excipients) to studies of forced degradation with the final product among others. Forced degradation studies comprise a range of assays aiming to expose the medicine to different stress conditions in order to guarantee both chemical stability of the API and the formation of degradation products (also known as impurities). The control of impurities' formation, whether coming from the process or formed during the shelf life of the product are of such importance as they may compromise the health of patient and impact on treatment in progress. The previous understanding of the formulation enables the entire lifecycle of a pharmaceutical product, once the loss of productive lots or lots in commercialization can cause financial impacts to the manufacturers and risk to the patients. It has been found that under thermal and humid stress conditions, the API ramipril presented in the form of pellets (sucrose and corn starch microspheres) undergoes degradation reactions generating impurities above the specification limit predicted in legislation for unknown impurities. Since this condition can be correlated to stability conditions predicted in legislation (30°C and 75% relative humidity for 24 months), there is a risk to the product at the end of the study. Thus, the present work focused on the structural elucidation of two impurities using mass spectrometry techniques with sequential fragmentation and nuclear magnetic resonance. It was possible to identify the chemical structures of the majority impurities in a conclusive way, being verified a transesterification reaction between the primary alcohol of the sucrose's fructose monomer (in its two anomeric forms) from the pellets and ramipril.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. CONTEXTO FARMACÊUTICO	1
1.2. ESTUDOS DE ESTABILIDADE E DE DEGRADAÇÃO FORÇADA.....	3
1.3. RAMIPRIL PELLET	6
2. OBJETIVOS	12
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	13
3.1. CINÉTICA DE FORMAÇÃO DAS IMPUREZAS	14
3.2. METODOLOGIAS ANALÍTICAS.....	14
3.2.1. DESCRIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO #1 (LC-DAD).....	14
3.2.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO #2 (LC-MS/MS).....	16
3.2.3. DESCRIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO #3 (LC-SPE-RMN).....	17
3.3. IDENTIFICAÇÃO POR LC-MS/MS.....	18
3.4. AVALIAÇÃO IN-SILICO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1. ESTUDO CINÉTICO DE FORMAÇÃO DAS IMPUREZAS.....	20
4.2. ADEQUAÇÃO DO MÉTODO PARA LC-MS/MS	21
4.3. IDENTIFICAÇÃO E PROPOSTA ESTRUTURAL POR LC-MS/MS.....	22
4.4. DETERMINAÇÃO DE MASSA EXATA DAS IMPUREZAS	34
4.5. ELUCIDAÇÃO POR LC-SPE-RMN	34
4.6. AVALIAÇÃO IN-SILICO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO	45
4.7. ESTRATÉGIAS DE CONTROLE E VALIDAÇÃO	47
5. CONCLUSÃO.....	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONTEXTO FARMACÊUTICO

O mercado farmacêutico brasileiro deve avançar da sexta posição no ranking mundial, que ocupa hoje, para a terceira até o ano de 2022¹. As indústrias farmacêuticas desenvolvem e lançam cada dia mais novos medicamentos no mercado nacional. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa)² é responsável, dentre outras atribuições, pelo registro do medicamento, que é o ato por meio do qual ela autoriza a comercialização deste produto, mediante “avaliação do cumprimento de caráter jurídico-administrativo e técnico-científico relacionada com a eficácia, segurança e qualidade destes produtos” segundo o Decreto nº 3.961 de 10 de outubro de 2001, revogado pelo Decreto nº 8.077 de 14 de agosto de 2013. A análise da documentação referente à Tecnologia Farmacêutica de um processo de registro de medicamento novo, genérico ou similar é atribuição da Gerência de Avaliação de Tecnologia de Registro de Medicamentos Sintéticos - GRMED.

O registro de medicamentos novos, genéricos e similares é regulamentado pela RDC nº 60, de 10 de outubro de 2014, cuja vigência se iniciou em 11 de janeiro de 2015³. Para tal registro uma série de documentos técnicos gerados durante o desenvolvimento do medicamento compõe um dossiê que deve ser apresentado para avaliação. Dentre esses documentos um estudo de estabilidade do produto precisa ser realizado seguindo critérios descritos na RE nº 01/05⁴, que em breve será substituído pelo Guia de estabilidade⁵ em publicação pela Anvisa. Também é necessário que se conduzam ensaios de degradação forçada nos medicamentos, em acordo com a RDC nº 53 de 4 de dezembro de 2015⁶, de modo a obter-se um melhor entendimento das rotas de degradação do produto e os produtos gerados.

Dados do Governo do Estado mostram que no Brasil, 300 mil pessoas sofrem infartos todos anos sendo 30% dos casos fatal. Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde, doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte do mundo, sendo que em 2016, 17 milhões de pessoas foram vítimas de doenças como derrames e ataques cardíacos⁷. A Libbs, indústria farmacêutica 100% brasileira fundada em 1958, conta com um amplo portfólio de especialidades (oncologia, ginecologia, cardiovascular, dermatologia, respiratória, neurologia e transplantes), com mais de produtos 90 produtos em 200 apresentações. Com os setores produtivos e de pesquisa no complexo de Embu das Artes (SP) e sede administrativa na cidade de São Paulo, tem como propósito contribuir para que

as pessoas alcancem uma vida plena. O Centro de Desenvolvimento Integrado (CDI) é o complexo de laboratórios responsável pelas pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novos produtos e rotas de síntese de princípios ativos. As etapas analíticas são conduzidas em paralelo ao desenvolvimento do produto, de modo a garantir a qualidade e robustez do processo produtivo. O setor de Desenvolvimento Analítico (DA) é responsável pelo desenvolvimento de métodos analíticos de matérias-primas e produtos acabados, e juntamente ao setor de Desenvolvimento Galênico (DG) – responsável pelo desenvolvimento das formulações e processos produtivos – avalia toda a etapa de desenvolvimento do produto e conduz as investigações necessárias de modo a garantir principalmente a qualidade do produto farmacêutico em termos da estabilidade química do princípio ativo e formação de impurezas.

O segmento industrial farmacêutico é conhecido pelo alto rigor em legislações que servem como diretrizes para garantir, principalmente, a qualidade e segurança dos medicamentos comercializados para a população. Ao redor do mundo, diversos órgãos reguladores se fazem presentes e continuamente são estabelecidas resoluções quanto à condução das etapas para o registro de um medicamento.

O FDA⁸ (*U.S. Food and Drug Administration*) é o organismo governamental norte-americano responsável pelo controle e fiscalização de alimentos e medicamentos. O ICH⁹ (*International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*) é a entidade de reconhecimento mundial que une órgãos reguladores dos Estados Unidos, Europa e Japão. No Brasil, a Anvisa é a agência responsável pelo controle sanitário da produção, consumo e serviço de medicamentos e é o órgão que concede o registro para a venda e distribuição à população. Suas resoluções estão, em grande parte, harmonizadas com os guias do ICH, FDA e as farmacopeias americana¹⁰ (USP), britânica¹¹ (BP) e europeia¹² (EP).

A estabilidade de fármacos é um parâmetro chave de qualidade, sendo definido como o tempo em que o medicamento mantém integralmente suas propriedades dentro dos limites de especificação estabelecidos, sendo a maneira com que se define seu prazo de validade. Em 2005, a Anvisa publicou a RE nº 01/05, um guia para a realização de estudos de estabilidade em fármacos. Os estudos de estabilidade são divididos em estudos de estabilidade de longa duração e estabilidade acelerada e fornecem resultados acerca da estabilidade do princípio ativo dentro da formulação final embalada. Nesta resolução já constavam regulamentações acerca da quantificação de produtos de degradação nos ensaios de estabilidade, porém, a forma como os experimentos deveriam ser conduzidos

não eram detalhadamente explicados, gerando dúvidas e diferentes interpretações sobre os ensaios que deveriam ser realizados.

Buscando sanar as dúvidas quanto à maneira como os ensaios de degradação forçada deveriam ser conduzidos, em 2008, a Anvisa emitiu o Informe Técnico nº 01/08¹³, que definiu como e quais as condições de estresse deveriam ser empregadas, bem como os prazos para adequação. Porém, não foram consideradas a grande gama de moléculas disponíveis e suas características intrínsecas, dificultando a elaboração de um único protocolo de degradação para ser aplicado a qualquer produto, gerando questionamentos pelas indústrias farmacêuticas. Foram levantados pontos a respeito de uma melhor diretriz para a condução dos estudos, bem como prazos adequados para a conclusão dos testes. Tais questionamentos levaram ao cancelamento do Informe Técnico nº 01/08 no mesmo ano de sua publicação.

Em 2013, a Anvisa publicou a RDC nº 58/13¹⁴, resolução que estabeleceu os parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e novamente o foco voltou-se aos produtos de degradação e as formas como conduzir os ensaios. Os produtos de degradação são impurezas resultantes de alterações químicas que surgem durante a fabricação ou armazenamento do medicamento. Esta resolução passou por Consulta Pública (CP nº 68/14)¹⁵ tendo sido amplamente discutida e atualizada para sua versão final, na RDC nº 53/15. Esta Resolução preconiza o estudo de estresse para o desenvolvimento de um método indicativo de estabilidade com o objetivo de conhecer os principais degradantes formados no produto, e também entender a labilidade do princípio ativo administrado.

1.2. ESTUDOS DE ESTABILIDADE E DE DEGRADAÇÃO FORÇADA

Os estudos de degradação forçada podem auxiliar a estabelecer as vias de degradação de um medicamento, a estabilidade intrínseca da molécula, e validar a capacidade indicativa de estabilidade dos procedimentos analíticos que serão empregados no acompanhamento da qualidade do produto acabado. Com a publicação da RDC nº 53/15, as empresas farmacêuticas adquiriram uma melhor compreensão de como realizar estes estudos.

Foram esclarecidos termos que, até então, levantavam questionamentos e diferentes interpretações, como por exemplo: O perfil de degradação (perfil de impurezas de degradação), é tido como o conjunto de todas as impurezas que podem vir a ser formadas

a partir da molécula do ativo principal, geralmente por condições de armazenamento e estocagem. Já o estudo de degradação forçada, são efetivamente os procedimentos experimentais realizadas com o intuito de forçar a degradação do fármaco para a avaliação das impurezas geradas acompanhado do método analítico validado segundo protocolos de validação^{6,16,17,40}.

Os produtos de degradação são impurezas oriundas de reações químicas que um medicamento pode sofrer com exposição a luz, temperatura, umidade, etc. Também é possível que interações entre fármaco e excipientes levem à formação de produtos de degradação. Condições de armazenamento e estocagem, reações com oxigênio ou reações com embalagens metálicas, também podem levar à degradação de um medicamento⁶.

Como exemplo, pode-se considerar um produto que, durante um experimento de degradação em condições ácidas (HCl 0,1N a 25°C por 14 dias) levou à formação do produto X. Este mesmo produto, quando estressado em condições básicas (NaOH 0,1N a 25 °C por 14 dias), levou à formação dos produtos Y+Z. Desta forma, o perfil de degradação forçada do produto é tido como X+Y+Z e é necessário que o método analítico se mostre seletivo para a quantificação de todos os produtos gerados.

As condições de estresse definidas na resolução são hidrólise ácida e básica, oxidação, fotólise, aquecimento, umidade e interação com metais e englobam os meios através dos quais um fármaco pode ser degradado. Tais produtos devem ser notificados, identificados e/ou qualificados de acordo com sua concentração encontrada. Baseado na dose máxima diária, são estabelecidas as especificações máximas de impurezas permitidas na formulação^{6,17,18}, sendo classificadas como desconhecidas, conhecidas e qualificadas. Via de regra, as impurezas desconhecidas possuem o menor limite de especificação, e uma vez conhecida sua estrutura química (por caracterização química completa) seu limite mínimo pode ser elevado de acordo com a tabela presente na RDC 53/15. Caso a substância passe por um estudo toxicológico e seja comprovada a ausência de risco, a impureza é tida como qualificada e seu limite pode ser elevado através deste estudo e justificativas técnico-científicas.

Os estudos de estabilidade e de degradação forçada são, idealmente, conduzidos em etapas iniciais do desenvolvimento, e norteiam as etapas de decisão quanto aos melhores protótipos de produto, em termos de estabilidade química e menores quantidades de impurezas. Em muitos casos, as condições de degradação forçada são mais agressivas frente às condições de estabilidade, de 30°C, 75% de umidade relativa (U.R.) por 24 meses.

Há casos em que condições simuladas de estresse podem representar realisticamente uma condição de estresse branda como é o caso da estabilidade, mas com uma cinética acelerada. As condições térmicas e úmidas como o caso da estabilidade acelerada (40°C, 75% U.R. por 6 meses) e degradação a 70°C, 75% U.R. por 14 dias (ou menos) podem representar de maneira bastante confiável a condição de estabilidade ao término de 24 meses. Produtos de degradação formados nestas condições podem representar certo risco ao produto e via de regra busca-se o entendimento sobre sua rota de formação e formas de mitigação. Estudos prévios podem gerar significativo entendimento sobre a formulação em desenvolvimento e sua estabilidade frente diversas condições.

O limite de especificação de impurezas conhecidas e desconhecidas para um insumo farmacêutico ativo deve ser traçado baseado nas especificações previstas nos guias do ICH (guia Q3A)¹⁹ levando em consideração a dose máxima diária do princípio ativo a ser administrado (Tabela 1.1).

TABELA 1.1. Cálculo dos limites de notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em fármacos.

	Dose máxima diária ¹	Limites ²
Limite de notificação	≤ 1g	0,1%
	> 1g	0,05%
Limite de identificação	< 1mg	1,0% ou 5µg ATD, o que for menor
	1mg-10mg	0,5% ou 20µg ATD, o que for menor
	>10mg-2g	0,2% ou 20mg ATD, o que for menor
	>2g	0,1%
Limite de qualificação	<10mg	1,0% ou 50µg ATD, o que for menor
	10mg-100mg	0,5% ou 200µg ATD, o que for menor
	>100mg-2g	0,2% ou 3mg ATD, o que for menor
	>2g	0,15%

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

Para um medicamento em que a dose máxima diária prevista em bula é de 10 mg (como o ramipril), observa-se os seguintes limites:

- Limite de Notificação: 0,1%
- Limite de Identificação: 0,2%
- Limite de Qualificação: 0,5%

Desta forma, impurezas que excedam o limite de 0,1% devem ser notificadas como impurezas desconhecidas. Impurezas presentes em 0,2% a 0,5% devem ser identificadas por caracterização química (ter sua estrutura química elucidada) e impurezas que excedam 0,5% em relação ao pico do princípio ativo devem ser qualificadas quanto ao risco toxicológico através de testes in-vivo.

1.3. RAMIPRIL PELLET

A definição estratégica da Libbs para a produção do ramipril em pellets (micro-esferas de sacarose + amido) se deu devido às vantagens que a utilização de fármacos nesta forma farmacêutica traz em termos de processabilidade e manuseio entre diferentes produtos da mesma linha medicamentosa²⁰.

De maneira geral, medicamentos podem ser entendidos como sistemas de liberação de fármacos, e, podem ser apresentados em diferentes formas farmacêuticas, tais como comprimidos, cápsulas, soluções, suspensões, emulsões, sprays inalatórios, adesivos transdérmicos, dentre outros. As características físico-químicas do IFA, juntamente ao seu mecanismo de ação no organismo auxiliam na definição da via de administração e a forma farmacêutica a ser desenvolvida^{21,26,27}.

Atualmente existem inúmeras formas farmacêuticas para administração oral, e os *pellets* (Figura 1.1) tem ganhado atenção, uma vez que apresenta diversas vantagens, tais como a possibilidade de associar dois ou mais princípios ativos não compatíveis em um mesmo produto, a utilização do mesmo *pellet* em diferentes associações, e também a praticidade na produção de diferentes dosagens para adultos e crianças por exemplo. São micro-esferas obtidas por processos de extrusão e esferonização, e o princípio ativo pode estar contido no núcleo do *pellet* ou aplicado superficialmente em um *pellet* de núcleo inerte (geralmente de sacarose e amido de milho).^{21,22,23,24,25}

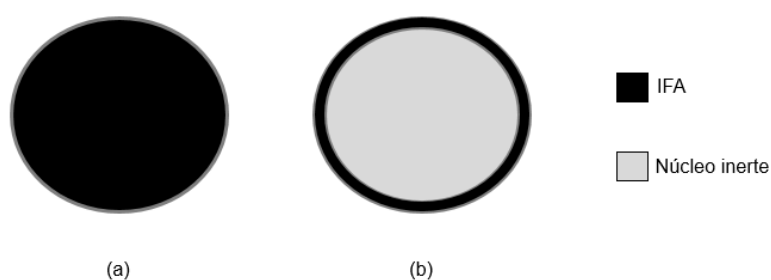


FIGURA 1.1. Representação esquemática de um (a) Pellet de IFA + excipientes e (b) Pellet inerte com IFA revestido superficialmente.

Atualmente a Libbs dispõe de um amplo portfólio de medicamentos no segmento cardiovascular, e o ramipril é administrado tanto isoladamente na forma de comprimidos (Naprix) ou também associado ao benzilato de anlodipino (Naprix A) ou à hidroclorotiazida (Naprix D) na forma de cápsulas²⁸. O processamento do ramipril (revestimento superficial do IFA em *pellets* de sacarose) facilita a produção dos medicamentos da linha Naprix A e D, uma vez que as diferentes dosagens são produzidas alterando-se a quantidade dos *pellets* que são encapsulados.

Concomitantemente ao desenvolvimento do produto ocorre o desenvolvimento de um método analítico indicativo de estabilidade, e uma das premissas para tal, é que o método atenda aos critérios descritos na RDC nº 53/15. O entendimento químico a respeito do princípio ativo e seus possíveis degradantes é mandatório, dessa forma, a química orgânica teórica aliada às técnicas instrumentais analíticas desempenham papel fundamental nos laboratórios de desenvolvimento farmacêutico^{6,29,30,31,32,33,34,35}.

O ramipril é um pró-fármaco e seu metabólito ativo, ramiprilato, possui ação anti-hipertensiva (Figura 1.2). O exato mecanismo da ação ainda é desconhecido, todavia sabe-se que está relacionado com a inibição competitiva da enzima de conversão da angiotensina I (ECA), que bloqueia a formação da antiotensina II, agente vasoconstritor, prevenindo a degradação da bradicinina, substância vasodilatadora. A diminuição na concentração da angiotensina II resulta também no aumento da atividade plasmática de renina, devido a eliminação do feedback negativo da liberação da renina e da secreção direta de aldosterona¹⁸.

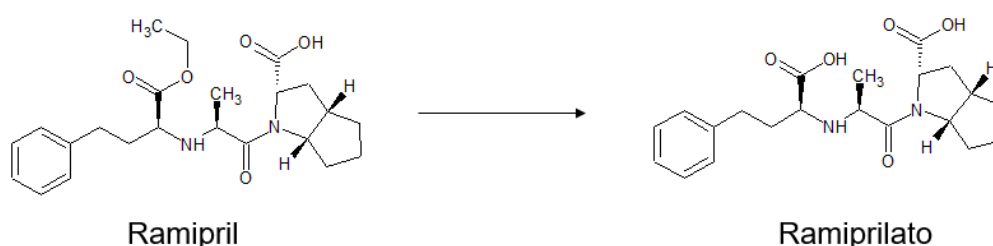


FIGURA 1.2. Estrutura molecular do ramipril e seu metabólito ativo ramiprilato.

É denominado quimicamente como (2S,3aS,6aS)-1-carboxila-3fenilpropilalanil octahidrociclopenta[b]pirrol-2-ácido carboxílico, 1-etil-éster; sua fórmula empírica é $C_{23}H_{32}N_2O_5$ e seu peso molecular 416,5 g/mol. É uma molécula ionizável, com 1 carboxila ácida (ioniza adotando carga negativa) e 1 amina secundária básica (ioniza adotando carga positiva) com valores de pKa e de distribuição de cargas conforme a seguir (Figuras 1.2 e 1.3)³⁶.

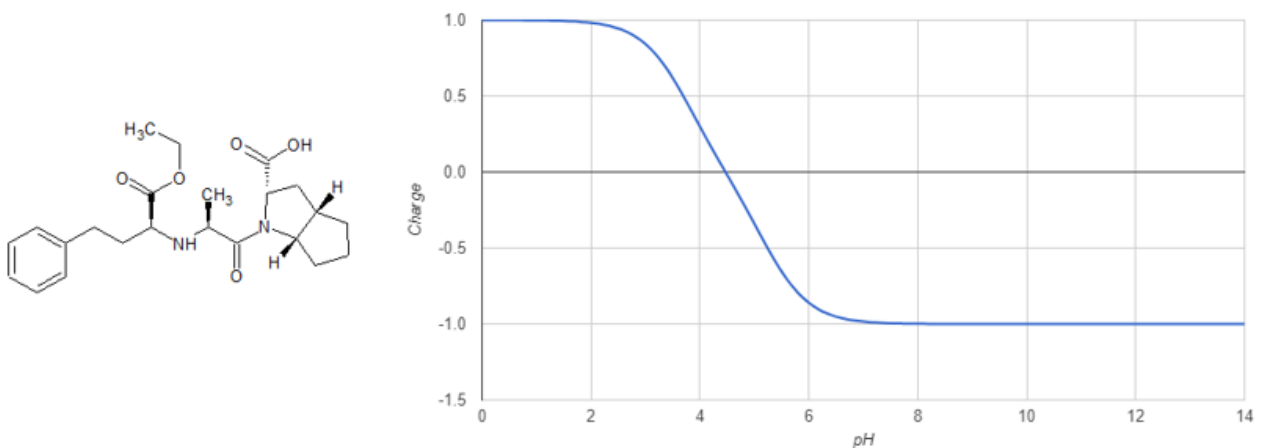


FIGURA 1.3. Distribuição de cargas e valores de pK_a para o ramipril.

Conforme pode-se visualizar na Figura 1.4, que compara a porcentagem de distribuição das microespécies de ramipril em função do pH, o ramipril somente encontra-se na sua forma neutra na faixa de pH entre 3,0 – 6,0. Todavia, por ser um zwitterion, sua forma neutra possui cargas opostas em diferentes átomos na mesma molécula, ou seja, nessa faixa de pH a amina secundária está protonada e o ácido carboxílico desprotonado. Já na faixa de pH entre 0-4 predomina a microespécie ionizada com carga positiva na amina secundária, e a partir do pH 5,0 predomina a microespécie ionizada com carga negativa na hidroxila do ácido carboxílico.

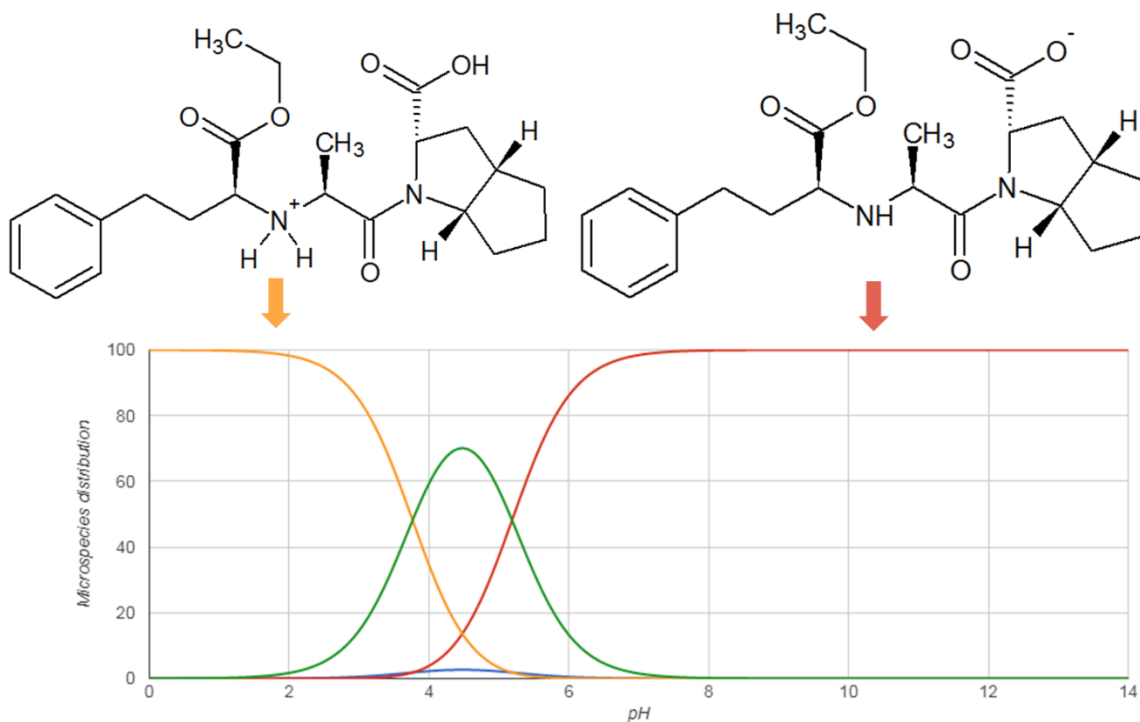


FIGURA 1.4. Distribuição de microespécies de ramipril de acordo com o pH.

O ramipril possui 8 grupamentos funcionais passíveis de degradação, conforme demonstrado abaixo (Figura 1.5).

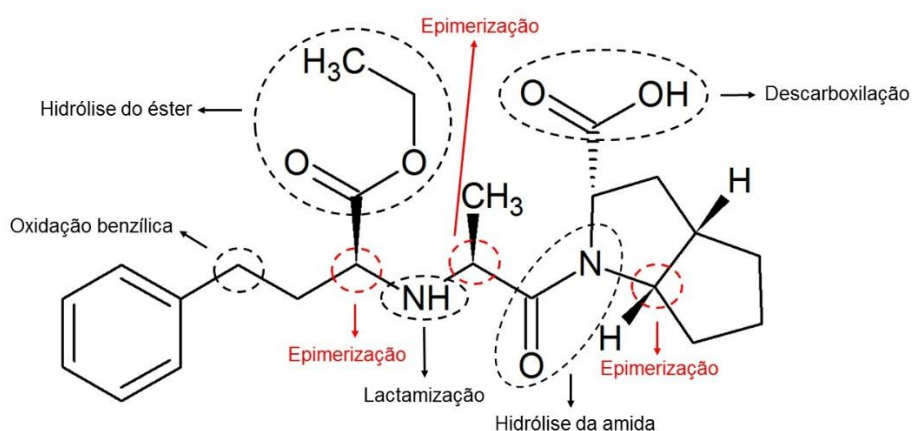


FIGURA 1.5. Grupamentos funcionais do ramipril susceptíveis à degradação.

O grupamento ácido carboxílico é susceptível à descarboxilação ou lactamização intramolecular em meio ácido e básico gerando a respectiva δ -lactona. As farmacopeias americana e britânica reportam duas impurezas conhecidas do ramipril, a impureza D proveniente de uma lactamização intramolecular e a impureza E proveniente da hidrólise do éster (Figura 1.6)^{37,38}. Os carbonos alfa aos nitrogênios (círculos vermelhos) são susceptíveis a epimerização em meio básico. Os hidrogênios benzílicos são susceptíveis a oxidação, podendo gerar os respectivos álcoois ou cetonas benzílicas. O grupamento éster e amida são susceptíveis a hidrólise, podendo gerar os respectivos ácidos carboxílicos. O produto de hidrólise do éster, denominado ramiprilato é o metabólito ativo do ramipril^{34,35}.

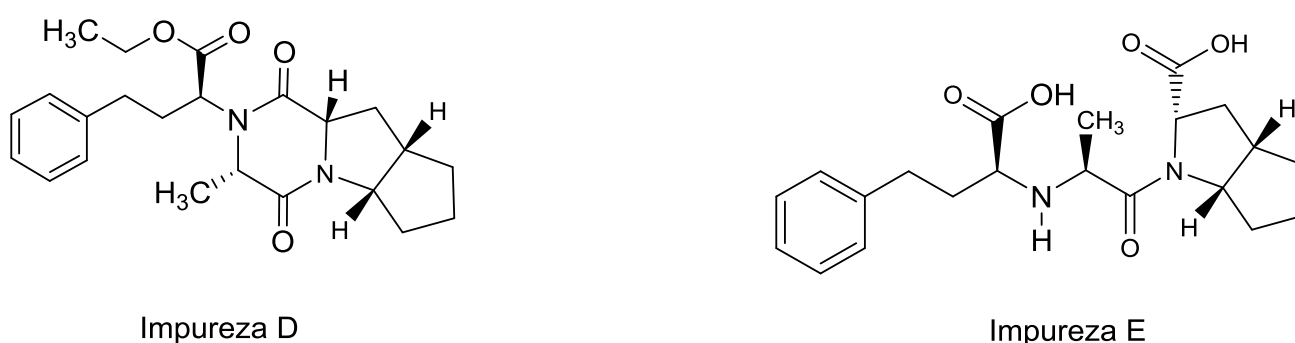


FIGURA 1.6. Impurezas farmacopeicas do ramipril.

O produto Naprix D é composto por *pellets* revestidos de ramipril e por uma mistura seca de hidroclorotiazida. Os dois processos são realizados de maneira independente, sendo que a junção dos dois ativos ocorre apenas no encapsulamento. Por serem dois semi-acabados distintos e que possuem micro ambientes isolados, a interação entre o ramipril e os

excipientes que compõem a hidroclorotiazida (e vice e versa) é muito pequena. Dessa forma, as únicas interações verificadas para cada ativo dizem respeito apenas aos componentes individuais de cada semi-acabado. A tabela abaixo (Tabela 1.2) apresenta a composição dos *pellets* de ramipril.

TABELA 1.2. Composição dos *pellets* de ramipril.

Componente	Percentual na fórmula (%)
ESFERAS AÇÚCAR 90% 0,60-0,71MM	78,0
RAMIPRIL (P/ PELLET)	7,6
CARBONATO DE SÓDIO	1,8
HIPROMELOSE E-15 LV (PREMIUM)	6,3
COPOVIDONA (VA 64)	6,3

Durante o desenvolvimento do estudo de degradação forçada do produto Naprix D, verificou-se que o estresse dos *pellets* de ramipril em meio térmico e úmido (70°C e 75% U.R. por 6 horas) gerou dois picos cromatográficos correspondentes a impurezas até então desconhecidas (Figura 1.7)³⁹.

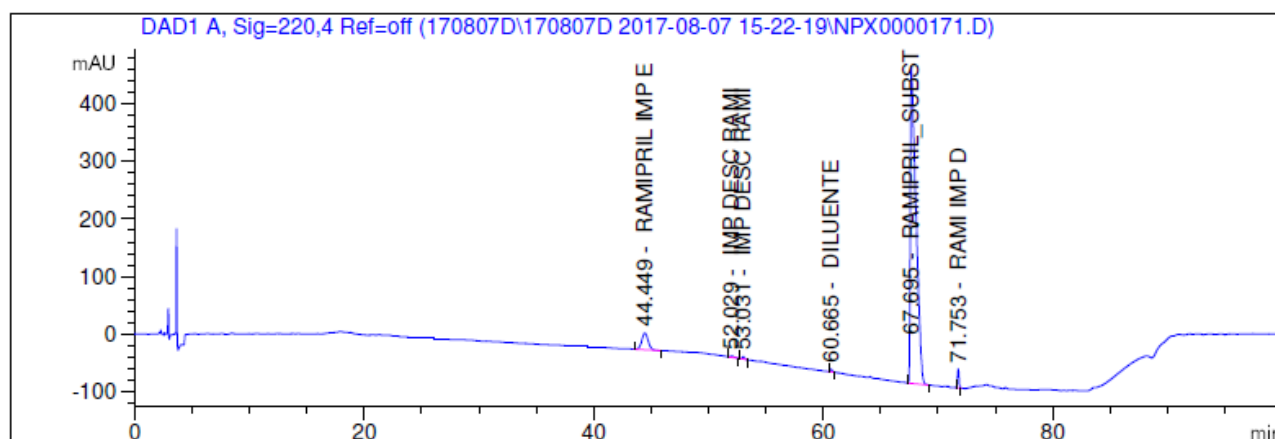


FIGURA 1.7. Cromatograma experimental do estresse térmico e úmido (70°C, 75%U.R. por 6 horas) de ramipril pellet. Método interno FE MA 830720.

As impurezas desconhecidas com tempos de retenção em 52 e 53 min apresentaram valores de concentração acima do limite de identificação de 0,2% (especificação para impurezas desconhecidas) e como a condição de estresse utilizada pode representar realisticamente as condições de estabilidade acelerada e de longa duração, entende-se a necessidade de identificação das substâncias encontradas. De acordo com o artigo 9º da RDC nº 53/15:

§ 4º O(s) produto(s) de degradação com percentual ou valor correspondente acima dos limites de identificação estabelecidos deverá(ão) ter sua estrutura química identificada e realizada a quantificação individual.

Sendo assim, após a identificação das substâncias e mitigado os riscos relacionados ao seu potencial genotóxico, é possível estabelecer uma nova especificação de acordo com a Tabela 1.1. Considerando-se a dose máxima diária de ramipril (10 mg, equivalente a duas cápsulas administradas diariamente), a especificação generalista para impurezas pode ser estabelecida como 0,2% para desconhecidas e 0,5% para conhecidas.

O Guia Prático nº 04/2015 fornece diretrizes para a identificação e ampliação de especificação. São métodos considerados aceitáveis de identificação de um produto de degradação:

1. Injeção de um padrão caracterizado ou farmacopeico de uma substância que tenha o mesmo tempo de retenção e o mesmo espectro de UV no método indicativo de estabilidade;
2. Um mecanismo de degradação proposto que leve a uma estrutura confirmada com uma técnica espectroscópica de caracterização (espectros de massas, de RMN, infravermelho);
3. Caracterização conclusiva, realizada com pelo menos duas técnicas espectroscópicas diferentes (espectros de massas, de RMN, infravermelho).

Dessa forma, a identificação das substâncias via espectrometria de massas (MS) com fragmentação (MS/MS) e/ou ressonância magnética nuclear (RMN) permite que as opções 2 ou 3 sejam empregadas.

2. OBJETIVOS

Identificar duas impurezas desconhecidas geradas durante o desenvolvimento do estudo de degradação forçada do ramipril sob forma de pellets na condição de estresse térmico e úmido a 70°C, 75% U.R. por 6 horas seguindo as premissas estabelecidas pelo Guia Prático nº 04/15.

Propor os mecanismos de formação das impurezas.

Avaliar as estruturas em relação ao potencial mutagênico seguindo as diretrizes da RDC nº 53/15.

3. PARTE EXPERIMENTAL

O estudo de degradação forçada e análises por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas em tandem (LC-MS/MS) foram realizados no Centro de Desenvolvimento Integrado (CDI) da Libbs Farmacêutica em Embu das Artes, São Paulo. As análises por cromatografia líquida com extração em fase sólida on-line acoplada ao ressonância magnética nuclear (LC-SPE-RMN) foram conduzidas em parceria ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) em São Carlos, São Paulo.

Os solventes orgânicos (acetonitrila e metanol) foram adquiridos da Merck e a água ultrapura do sistema milli-Q da Millipore. O padrão de ramipril (IFA) utilizado corresponde ao lote 47477 do fabricante Aarti Industries Ltd. O ramipril pellet utilizado no estresse foi o lote 17D0411 e o placebo de ramipril pellet utilizado foi o lote PLA075/17.

Os ensaios de estresse térmico e úmido foram conduzidos em câmara controlada (Mecalor, Brasil) mantida a 70°C e 75% U.R. As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram conduzidas com uma coluna analítica Inertsil ODS-3V 5µm 250,0x4,6mm (GL Sciences, Japão) com os seguintes sistemas analíticos: HPLC 1260 com bomba quaternária e detector de arranjo de diodos e UHPLC 1290 (Agilent, Estados Unidos) acoplado ao espectrômetro de massas modelo TripleTOF 4600 (AB Sciex, Estados Unidos) com fonte de ionização por *electrospray* (ESI) e analisadores quadrupolo e tempo de voo (QToF).

Para a obtenção dos espectros de RMN 1D e 2D das impurezas desconhecidas, as amostras de ramipril pellet estressadas foram submetidas ao preparo prévio utilizando-se da técnica de LC-SPE. O sistema LC-SPE utilizado no laboratório Laboratório de RMN da UFSCar constitui de um cromatógrafo 1200 series (Agilent, Estados Unidos) acoplado a uma unidade Prospekt 2. O HPLC é composto por uma bomba quaternária e detector de arranjo de diodos. A unidade Prospekt 2 é constituída por uma bomba extra (K120 Knauer Smartline Pump Control 100, Bruker Daltonik GmbH, V01.11); um organizador onde são alocados os frascos com solventes deuterados e não deuterados; unidade trocadora de cartuchos (ACE – Automatic Cartridges Exchanger – LC-SPE-NMR Interface, Prospekt 2, Bruker Daltonik GmbH) e unidade de Stopped-Flow (BSFU-HP – Bruker Stopped Flow Unit – High Performace Bruker Biospin GmbH e válvulas VALCO). Todos os espectros foram obtidos em um equipamento de 14,1 Tesla (600 MHz para frequência do hidrogênio), equipado com uma sonda criogênica de 5 mm de diâmetro interno.

A avaliação dos dados e interpretação dos espectros de MS e RMN foram realizadas junto ao Laboratório de Bioquímica Micromolecular de Microorganismos (LaBioMMi) sob orientação do Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho.

3.1. CINÉTICA DE FORMAÇÃO DAS IMPUREZAS

Buscando maximizar a concentração de impurezas na amostra, foi realizado um estudo cinético de formação. Os pellets de ramipril foram estressados a 70°C e 75% U.R. com alíquotas analisadas em 0, 2, 4, 6, 12, 18 e 24hs.

3.2. METODOLOGIAS ANALÍTICAS

As análises foram conduzidas por cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (LC-DAD) e com detecção por espectrometria de massas (LC-MS). O primeiro método utilizado (método analítico #1) foi empregado tal como descrito no método analítico interno FE MA 830720 (LC-DAD). O segundo método (método analítico #2) foi utilizado nas análises por espectrometria de massas (LC-MS). Foram feitas adaptações em relação ao primeiro método, com alteração do gradiente de eluição, temperatura da coluna e quantidade de componentes da fase móvel visando adequabilidade ao espectrômetro de massas. Para a obtenção dos espectros de RMN um terceiro método foi utilizado, otimizado para a concentração das substâncias nos cartuchos de SPE partir do método analítico #1. As condições cromatográficas estão descritas a seguir.

3.2.1. DESCRIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO #1 (LC-DAD)

TABELA 3.1. Condições cromatográficas empregadas no método analítico #1.

Coluna	Inertsil ODS-3V 250x4,6mm 5µm
Detector	DAD λ=220nm
Fase móvel	Fase móvel A : Fase móvel B (conforme Tabela 3.2)
Diluyente	Tampão pH 5,5 : ACN (80:20)
Fluxo	1,0mL/min
Temperatura da coluna	55°C
Temperatura do amostrador	15°C
Volume de injeção	20µL
Tempo de corrida	100 minutos

TABELA 3.2. Gradiente de eluição empregado no método analítico #1.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	95	5
12	95	5
45	75	25
70	30	70
80	30	70
85	95	5
100	95	5

Preparo das soluções

Solução tampão pH 5,5: Pesou-se 0,385g de acetato de amônio e dissolvido em 1000mL de água ultrapura. Adicionou-se volumetricamente 1,0mL de trietilamina e agitou-se até completa solubilização. O pH foi ajustado para 5,5 com ácido acético.

Solução orgânica: Preparou-se uma mistura de acetonitrila e metanol na proporção de 60:40 respectivamente. Agitou-se e desgaseificou-se a solução com auxílio do ultrassom.

Fase móvel A: Preparou-se uma mistura da solução tampão pH 5,5 e da solução orgânica na proporção de 95:5 respectivamente. A solução foi homogeneizada e desgaseificada.

Fase móvel B: Preparou-se uma mistura de metanol e acetonitrila na proporção de 60:40 respectivamente. A solução foi homogeneizada e desgaseificada.

Diluyente: Preparou-se uma mistura da solução tampão pH 5,5 e acetonitrila na proporção de 80:20 respectivamente. A solução foi homogeneizada.

Preparo da amostra

Pesou-se analiticamente 666,67mg de ramipril pellet (equivalente a 50,0mg de ramipril) e transferiu-se quantitativamente para frasco de vidro. A amostra foi levada à câmara térmica úmida a 70°C e 75% de U.R. por 6 horas. Adicionou-se 40mL de diluyente e levou-se ao ultrassom por 60 minutos com agitações ocasionais. Retirou-se do ultrassom, aguardou-se a estabilização da temperatura da amostra e completou-se o balão com diluyente. A amostra foi homogeneizada e deixada em repouso por 10 minutos. Filtrou-se em membrana PVDF de 0,45µm e 25mm, descartando os primeiros 2mL. Concentração de trabalho: 1mg/mL de ramipril.

3.2.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO #2 (LC-MS/MS)

TABELA 3.3. Condições cromatográficas empregadas no método analítico #2.

Coluna	Inertsil ODS-3V 250x4,6mm 5µm
Detector	Espectrômetro de massas (quadrupolo e tempo de voo)
Fase móvel	Fase móvel A : Fase móvel B (conforme Tabela 3.4)
Diluyente	Água ultrapura : ACN grau MS (80:20)
Fluxo	1,0mL/min
Temperatura da coluna	55°C
Temperatura do amostrador	15°C
Volume de injeção	20µL
Tempo de corrida	100 minutos

TABELA 3.4. Gradiente de eluição empregado no método analítico #2.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	90	10
10	90	10
60	30	70
75	30	70
80	90	10
100	90	10

TABELA 3.5. Parâmetros de ionização da fonte electrospray.

Modos de ionização	Electrospray positivo (ESI+) negativo (ESI-)
Fonte de gás 1 (GS1)	50
Fonte de gás 2 (GS2)	40
Gás "curtain"(CUR)	25
Temperatura da fonte (TEM)	600
Tensão do capilar (ISVF)	+4500 / -4500
Potencial de declusterização (DP)	+100 / -100
Energia de colisão (CE)	+10 / -50

Preparo das soluções

Solução orgânica: Preparou-se uma mistura de acetonitrila e metanol grau MS na proporção de 60:40 respectivamente. Agitou-se e desgaseificou-se a solução com auxílio do ultrassom.

Fase móvel A: Pesou-se 0,385g de acetato de amônio e dissolvido em 1000mL de água ultrapura. Adicionou-se volumetricamente 0,4mL de trietilamina e agitou-se até completa solubilização. O pH foi ajustado para 5,5 com ácido acético. A solução foi homogeneizada e desgaseificada.

Fase móvel B: Preparou-se uma mistura de metanol e acetonitrila grau MS na proporção de 60:40 respectivamente. A solução foi homogeneizada e desgaseificada.

Diluyente: Preparou-se uma mistura de água ultrapura e acetonitrila grau MS na proporção de 80:20 respectivamente. A solução foi homogeneizada.

Preparo da amostra

Pesou-se analiticamente 666,67mg de ramipril pellet (equivalente a 50,0mg de ramipril) e transferiu-se quantitativamente para frasco de vidro. A amostra foi levada à câmara térmica úmida a 70°C e 75% de U.R. por 6 horas. Adicionou-se 40mL de diluyente e levou-se ao ultrassom por 60 minutos com agitações ocasionais. Retirou-se do ultrassom, aguardou-se a estabilização da temperatura da amostra e completou-se o balão com diluyente. A amostra foi homogeneizada e deixada em repouso por 10 minutos. Filtrou-se em membrana PVDF de 0,22µm e 25mm, descartando os primeiros 2mL. Concentração de trabalho: 1mg/mL de ramipril.

3.2.3. DESCRIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO #3 (LC-SPE-RMN)

TABELA 3.6. Condições cromatográficas empregadas no método analítico #3.

Coluna	Inertsil ODS-3V 250x4,6mm 5µm
Detector	DAD λ=220nm
Fase móvel	Fase móvel A : Fase móvel B (conforme Tabela 3.7)
Diluyente	Tampão pH 5,5 : ACN (80:20)
Fluxo	0,6mL/min
Temperatura da coluna	55°C
Temperatura do amostrador	15°C
Volume de injeção	60µL
Tempo de corrida	85 minutos

TABELA 3.7. Gradiente de eluição empregado no método analítico #3.

Tempo (min)	Fase móvel A (%)	Fase móvel B (%)
0	95	5
8	95	5
20	75	25
50	30	70
60	30	70
65	95	5
85	95	5

Preparo da amostra

Pesou-se analiticamente 1333,32mg de ramipril pellet (equivalente a 100,0mg de ramipril) e levou-se à câmara térmica a 70°C por 75% de U.R. por 6 horas. Adicionou-se 40mL de diluyente e levou-se ao ultrassom por 60 minutos com agitações ocasionais. Retirou-se do ultrassom, aguardou-se a estabilização da temperatura da amostra e completou-se o

balão com diluente. A amostra foi homogeneizada e deixada em repouso por 10 minutos. Filtrou-se em membrana PVDF de 0,45µm e 25mm, descartando os primeiros 2mL. Concentração de trabalho: 2mg/mL de ramipril.

A amostra foi submetida à sucessivas injeções no método de HPLC para posterior avaliação no RMN. Para a pré-concentração dos analitos de interesse foi utilizado cartucho SPE de polidivinilbenzeno do tipo HySphere C18 (10µm) previamente condicionados com acetonitrila e equilibrado com água. Os dois picos foram coletados no modo *time slice* e nomeados como banda 1 - b1 e banda 2 - b2. As amostras foram retiradas dos cartuchos, agrupadas, secas em nitrogênio gasoso e dissolvidas em CD₃OD (metanol deuterado). Todos os espectros foram obtidos em um equipamento de 14,1 Tesla (600MHz para frequência do hidrogênio), equipado com uma sonda criogênica de 5 mm de diâmetro interno. Dissolveu-se todo o material retido nos cartuchos de SPE em metanol deuterado (Across Organic lote A0359304) com aproximadamente 60µL e, inseridos em um capilar de 3mm de diâmetro, usando como referência interna o sinal do solvente e mantendo-se a temperatura de 298K durante todos os experimentos. Os principais parâmetros utilizados na aquisição e no processamento dos espectros encontram-se listados juntamente com os mesmos.

3.3. IDENTIFICAÇÃO POR LC-MS/MS

Uma vez que o método desenvolvido utiliza uma quantidade elevada de trietilamina, que possui relatos documentados de supressão do sinal do espectrômetro de massas e que pode contaminar a fonte de ionização, optou-se por adaptar o método cromatográfico utilizado (FE MA 830720) reduzindo-se de 0,1% para 0,04%. Adequações adicionais ao gradiente foram realizadas com o intuito de promover uma maior ionização dos analitos. Os demais parâmetros cromatográficos mantiveram-se inalterados. Acoplado em série ao detector de arranjo de diodos (DAD), utilizou-se um espectrômetro de massas TripleTOF 4600 (AB Sciex, Estados Unidos), com analisadores do tipo quadrupolo e tempo de voo em tandem. O modo de ionização utilizado foi ESI (*Electrospray Ionization*), com polaridades positiva e negativa e foram avaliadas as melhores condições de ionização e fragmentação das moléculas através da utilização de rampas de energia de colisão e alteração de parâmetros de ionização.

3.4. AVALIAÇÃO IN-SILICO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO

Visando assegurar qualidade, eficácia e segurança do medicamento, foram realizadas predições *in-silico* do potencial mutagênico para as estruturas identificadas. Foram utilizados os softwares de predição *Derek* (que baseia-se em predições de mutagenicidade bacteriana) e *Sarah* (que baseia-se em predições por alertas estruturais presentes em literatura), em conformidade com procedimentos preconizados em guias internacionais específicos, como o ICH M7. As predições realizadas são capazes de apontar a molécula em avaliação com potencial mutagênico pela presença de alertas estruturais positivos ou negativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDO CINÉTICO DE FORMAÇÃO DAS IMPUREZAS

Conforme observado nos estudos de degradação forçada (EDP 012_17), embora a concentração das impurezas desconhecidas seja relativamente baixo (aproximadamente 0,3%) esta quantidade excede os limites de especificação para impurezas desconhecidas.

Uma vez que o interesse tornou-se a elucidação estrutural das impurezas, avaliou-se o tempo de reação de degradação forçada visando aumentar a concentração das impurezas para obtenção de um melhor sinal no espectrômetro de massas. Conforme mencionado no item 3.1. amostras foram levadas ao estresse térmico úmido a 70°C, 75% U.R. em tempos de 0, 2, 4, 6, 12, 18 e 24 horas, conforme ilustrado abaixo (Figura 4.1).

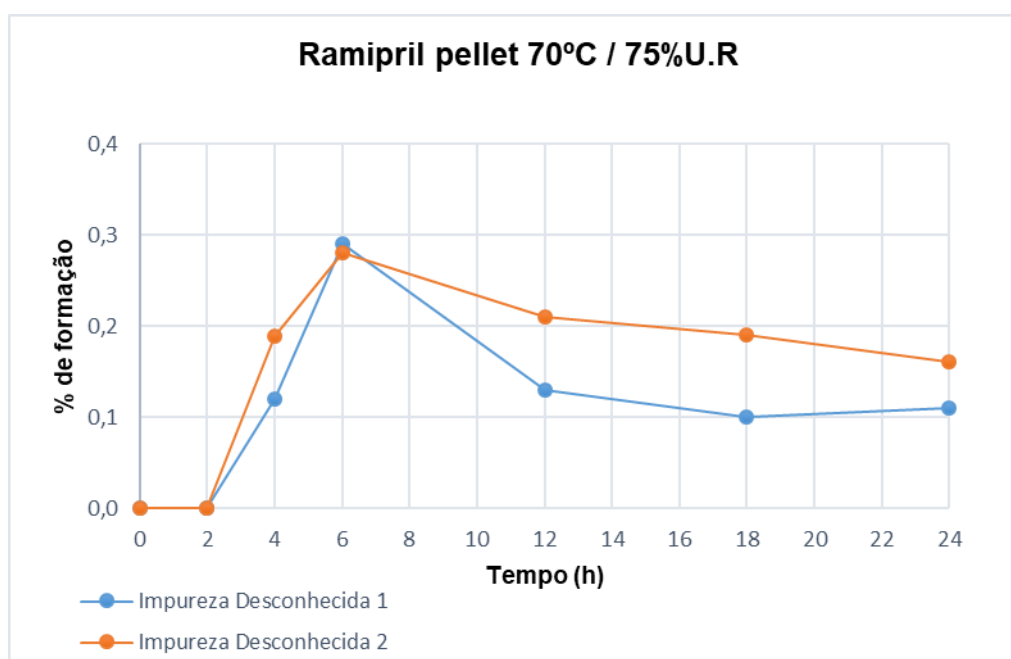


FIGURA 4.1. Cinética de formação das impurezas desconhecidas a 70°C, 75% U.R. em 24 horas.

Não verificou-se um aumento expressivo na concentração das impurezas de interesse durante o estudo cinético. O tempo de reação de 6 horas, correspondente à formação de aproximadamente 0,3% de impurezas foi mantido para posteriores experimentos. Foi possível observar que a formação das impurezas não ocorre com o aumento do tempo, fato que fornece subsídios para prever que, nas condições reais de estabilidade, as impurezas podem atingir um máximo de formação e não excederem os limites de especificação desejados através desta investigação.

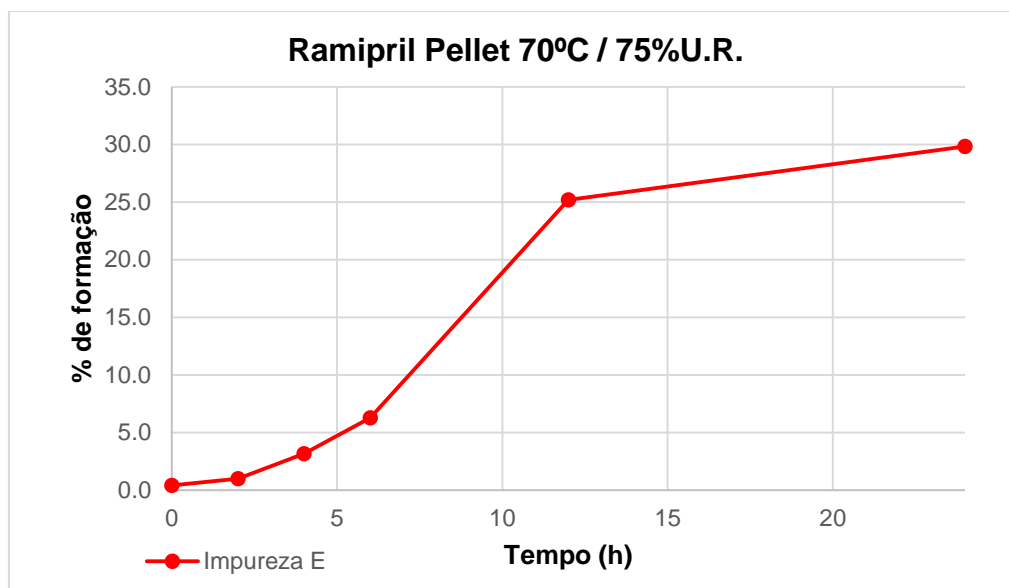


FIGURA 4.2. Cinética de formação da impureza E a 70°C, 75% U.R. em 24 horas.

Também foi possível observar que a reação mais susceptível a ocorrer nestas condições de estresse é de fato a conversão do ramipril para o ramiprilato (também conhecido como impureza E) através da hidrólise do éster (Figura 1.2). O mesmo estudo cinético foi conduzido para a impureza E em termos de porcentagem de formação ao longo do tempo (0, 2, 4, 6, 12 e 24hs) nas mesmas condições de estresse citadas anteriormente (Figura 4.2). Desta forma-se, entende-se que uma vez formada uma quantidade de tais impurezas, a mesma estabiliza-se e não continua sendo gerada ao longo do tempo, podendo até mesmo ser degradada conforme observado na Figura 4.1 por uma queda sutil de concentração entre 12 e 24 horas.

4.2. ADEQUAÇÃO DO MÉTODO PARA LC-MS/MS

Primeiramente, avaliou-se a aplicabilidade do método adaptado na detecção e quantificação das impurezas desconhecidas. Para isso, a mesma amostra foi analisada pelos dois métodos e seus resultados comparados. A Figura 4.3 apresenta os resultados da comparação.

Observa-se que um deslocamento ocorre para todos os picos do cromatograma. No entanto, a ordem de eluição não foi afetada. Dessa forma, o método mostrou-se aplicável para uso durante a investigação.

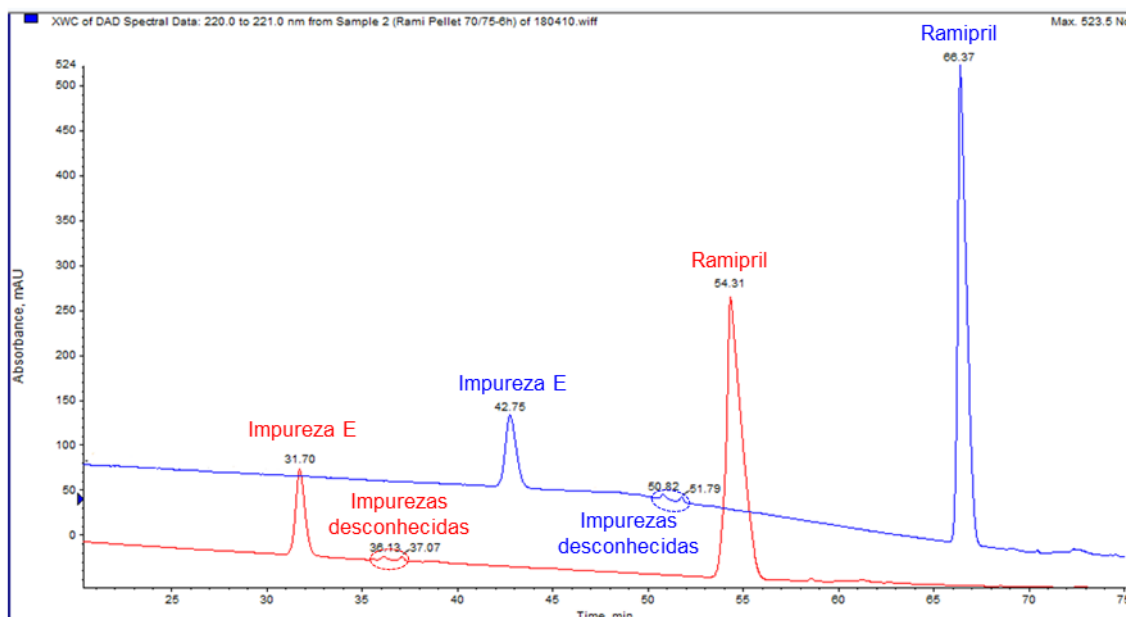


FIGURA 4.3. Comparação entre o método FE MA 830720 (em azul) e o proposto para LC-MS/MS (em vermelho). Detecção por UV a 220nm.

4.3. IDENTIFICAÇÃO E PROPOSTA ESTRUTURAL POR LC-MS/MS

A Figura 4.4 apresenta a sobreposição dos cromatogramas obtidos em UV 220nm das amostras controle e estressada (70°C, 75% U.R. por 6 horas). Observa-se, na amostra estressada, o aumento de dois picos com tempos de retenção 35,5 e 36,4 minutos, respectivamente.

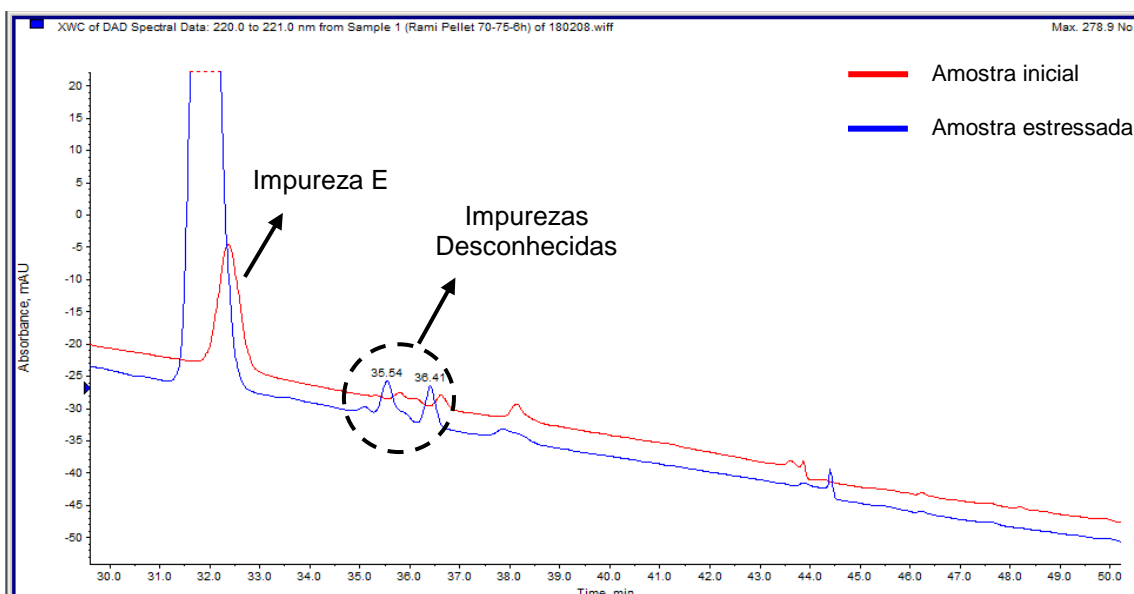


FIGURA 4.4. Sobreposição dos cromatogramas UV 220 nm da amostra inicial de ramipril pellet (em vermelho) e da amostra estressada a 70°C, 75% U.R por 6 horas (em azul).

Uma vez que o espectrômetro de massas foi operado em modo *Scan* (possibilitando a obtenção de espectros de varredura de massas), os espectros de massas nos tempos de

retenção mencionados, além do espectro de massas do ativo ramipril (para comparação), foram obtidos. Os espectros são apresentados nas Figuras 4.5 (polaridade negativa) e 4.6 (polaridade positiva).

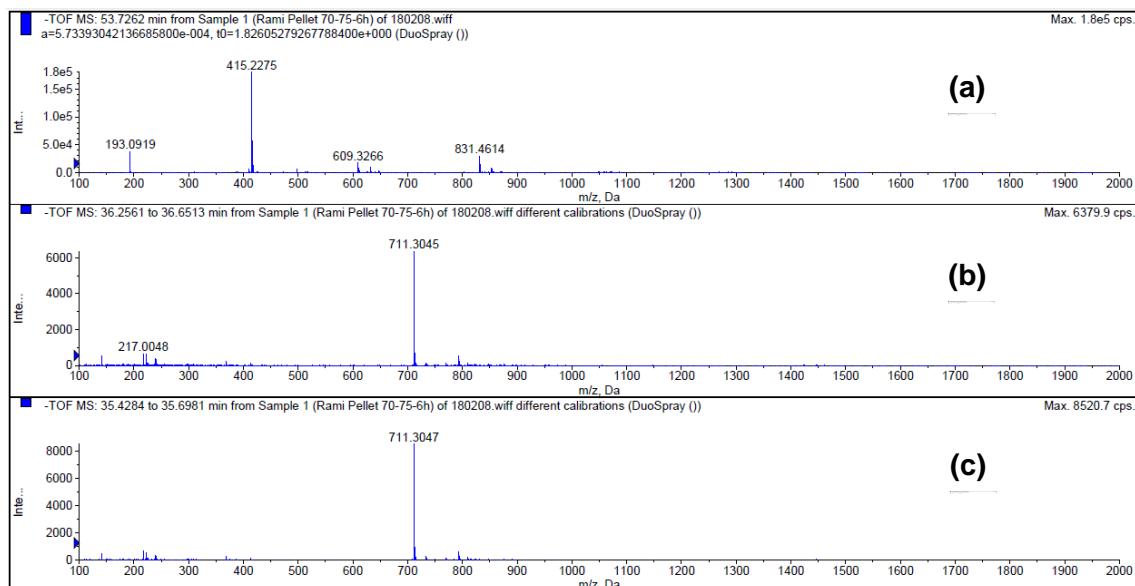


FIGURA 4.5. Espectros de massas, no modo negativo, obtidos para o (a) ramipril, o (b) pico em 36,4 minutos e o (c) pico em 35,5 minutos.

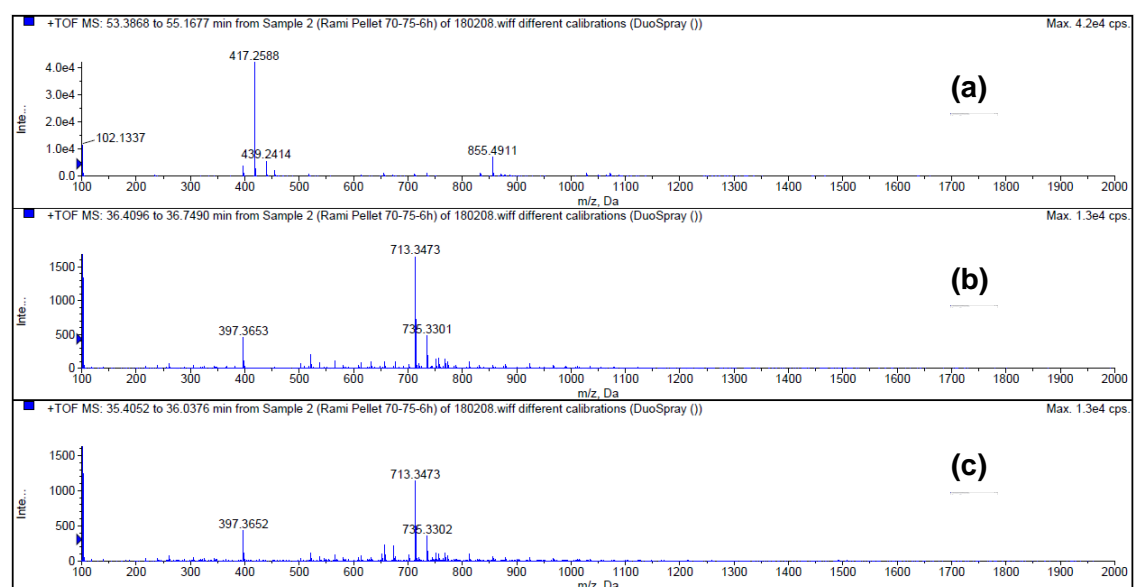


FIGURA 4.6. Espectros de massas, no modo positivo, obtidos para o (a) ramipril, o (b) pico em 36,4 minutos e o (c) pico em 35,5 minutos.

Observa-se, primeiramente, que ambos os picos das impurezas apresentam o mesmo fragmento majoritário: 711,3Da para o modo negativo e 713,3Da para o modo positivo. O aumento de massa observado para as impurezas, em relação à massa do ativo ramipril (que é de aproximadamente 416Da) foi de 296Da.

As Figuras 4.7 e 4.8 apresentam os cromatogramas de massas em XIC (*extracted ion chromatogram* - ferramenta que mostra apenas as massas selecionadas) para as razões massa/carga (m/z) 711Da (modo negativo) e 713Da (modo positivo) da amostra de ramipril *pellet* estressado. De fato, os íons foram observados apenas nas regiões com mesmo tempo de retenção das impurezas (conforme Figura 4.4), indicando que os íons são realmente originários das impurezas e não fruto de contaminação.

Adicionalmente, os resultados indicam que a massa molecular de ambos os picos investigados é de 712Da.

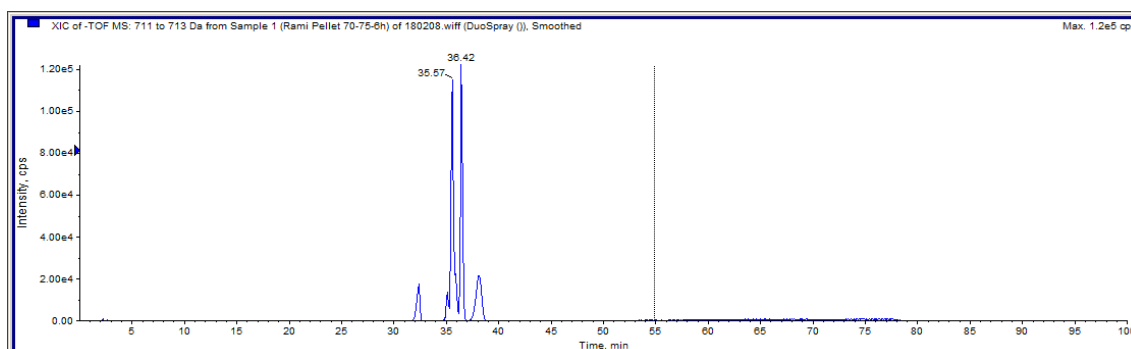


FIGURA 4.7. Cromatograma XIC da massa 711Da (modo negativo) da amostra de ramipril *pellet* estressada.

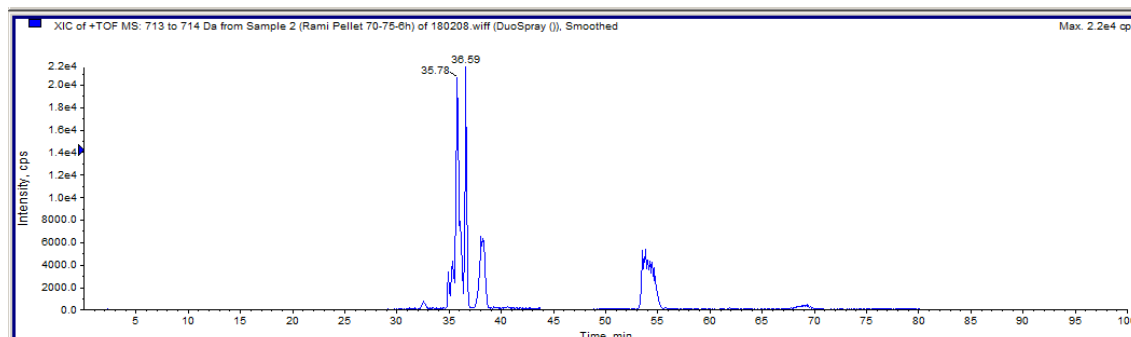


FIGURA 4.8. Cromatograma XIC da massa 713Da (modo positivo) da amostra de ramipril *pellet* estressada.

Como o mesmo valor de massa foi identificada nos dois modos de ionização, a possibilidade de que esse resultado seja devido a um aduto formado entre a impureza e um dos componentes da fase móvel é consideravelmente reduzida. Dessa forma, mais experimentos foram realizados com intuito de obter informações estruturais a respeito das impurezas desconhecidas. Para tal, a amostra estressada foi analisada novamente com o espectrômetro de massas operando em modo *Product Ion*, no qual é possível filtrar massas específicas no primeiro analisador (quadrupolo) e fragmenta-las posteriormente na cela de colisão, resultando em informações ricas a respeito de grupos funcionais e estrutura molecular.

Deste modo, um cromatograma foi adquirido no modo negativo com filtro para as massas 711,3Da e 415,2Da, para comparação entre o padrão de fragmentação das impurezas desconhecidas e do ativo ramipril.

As Figuras 4.9 e 4.10 apresentam o espectro de fragmentação da molécula de ramipril e a sua interpretação, respectivamente. A elucidação estrutural dos fragmentos de ramipril é importante pois pode fornecer indícios a respeito das regiões da molécula que foram alvo das reações que geraram as impurezas desconhecidas.

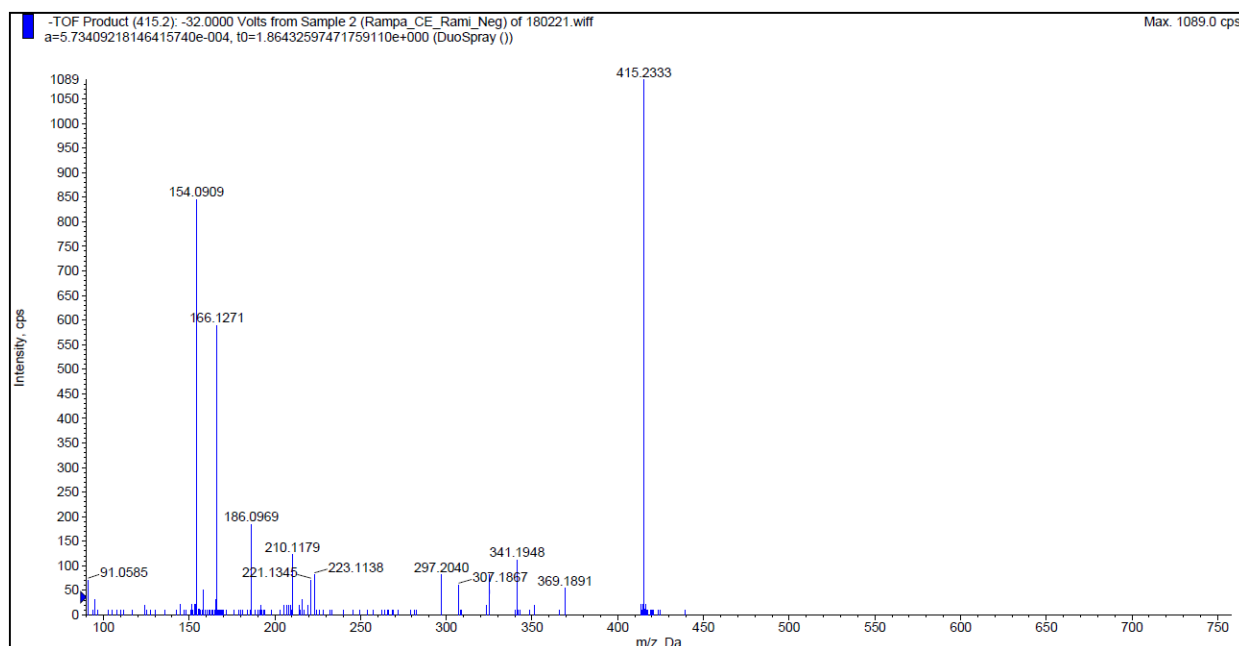


FIGURA 4.9. Padrão de fragmentação da molécula ramipril obtido no experimento Product Ion.

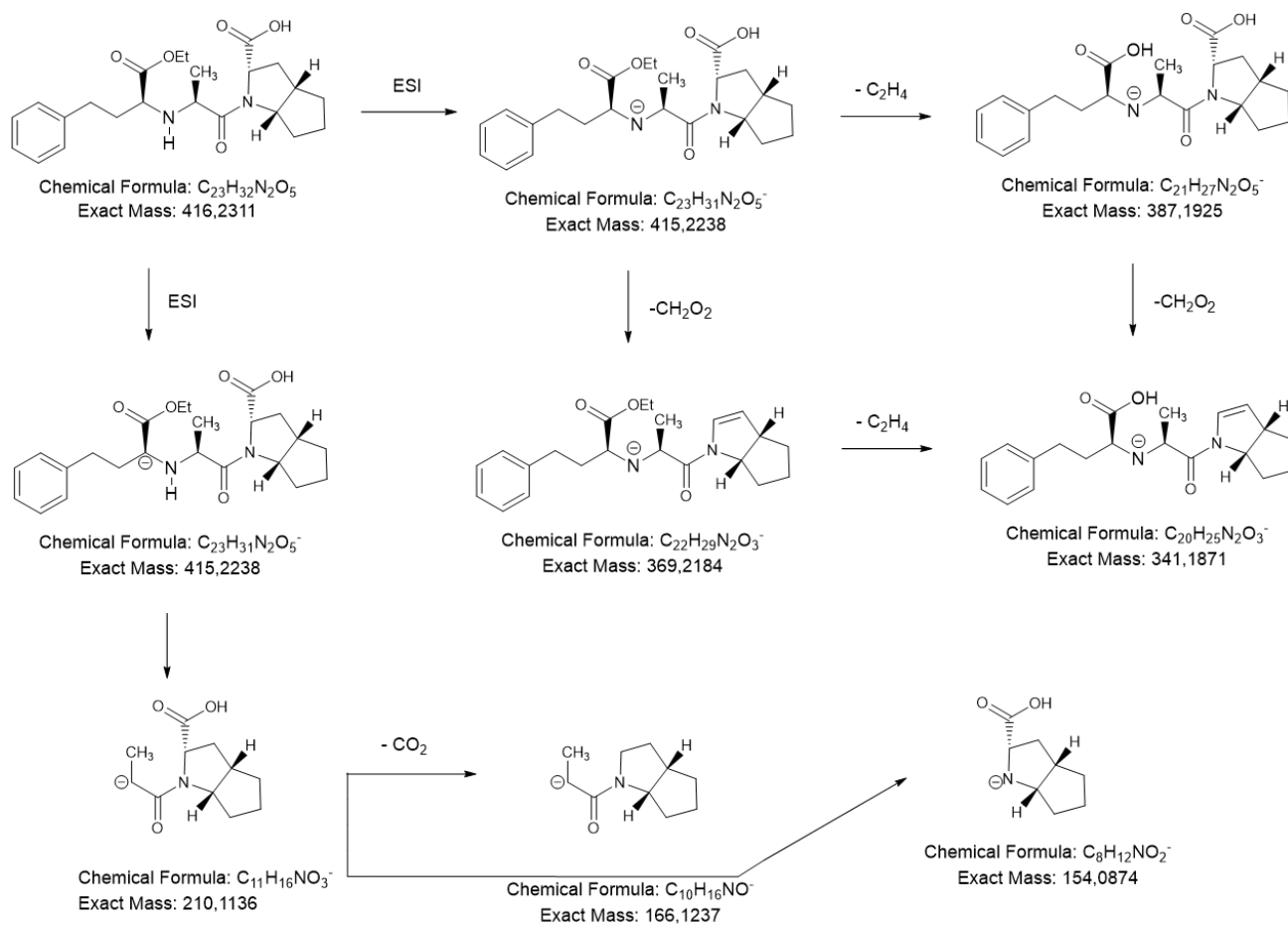


FIGURA 4.10. Proposta apresentada para a fragmentação do IFA ramipril.

Na Figura 4.11 são apresentados os espectros de fragmentação obtidos para os picos das impurezas desconhecidas. É possível observar diversos fragmentos em comum em relação ao padrão de fragmentação do ativo ramipril, como: 387Da, 369Da e 154Da, o que corrobora a hipótese de que as impurezas desconhecidas são provenientes dele.

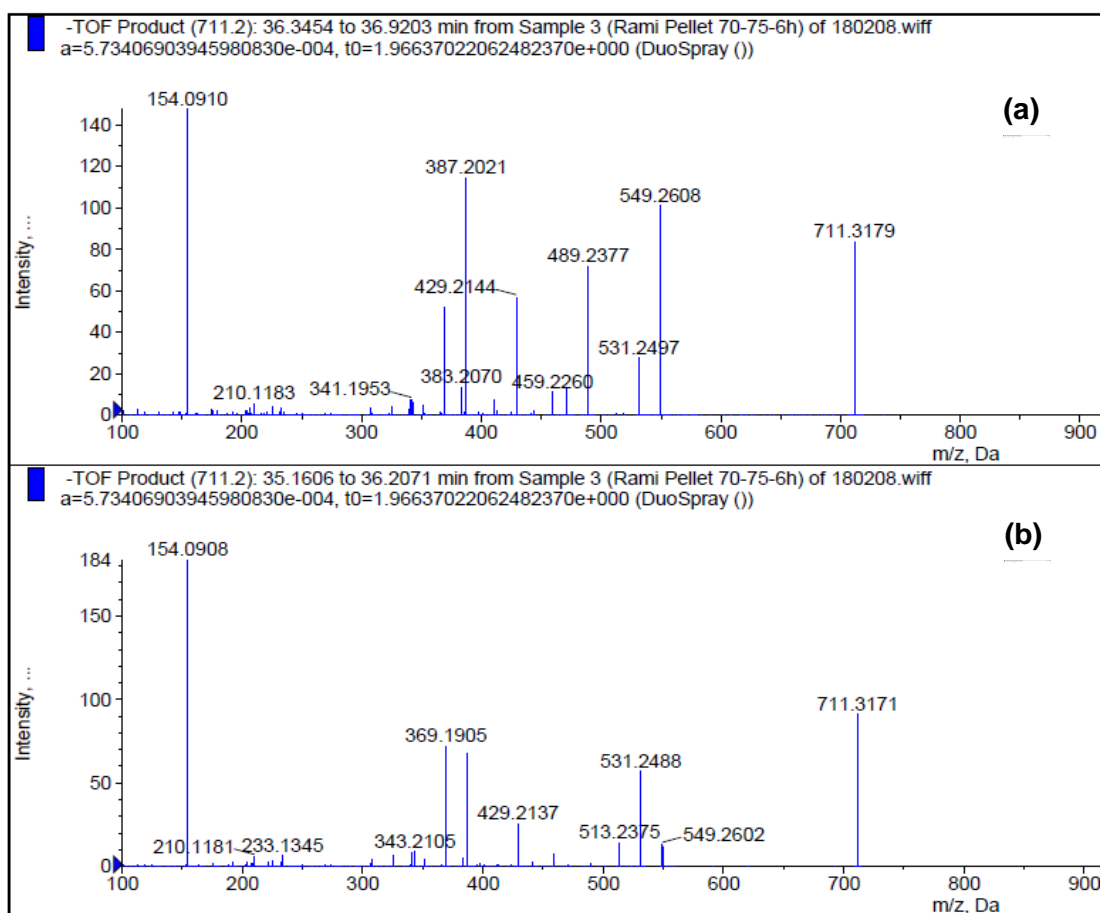


FIGURA 4.11. Padrão de fragmentação obtido para o (a) pico em 36,4 minutos e para o (b) pico em 35,5 minutos.

Para a determinação de possíveis estruturas para as impurezas desconhecidas investigadas, diversos fatores foram levados em consideração:

- Interação entre o princípio ativo e os excipientes: o ramipril é aplicado a pellets cuja composição consiste em sacarose e amido.

- As impurezas desconhecidas são formadas somente nas amostras de ramipril pellet por degradação forçada, submetendo-as a estresse térmico e úmido, mas não são formadas em ramipril IFA isolado ou placebo de *pellets* isolado (Figura 4.12).

- Fragmentos em comum ao ramipril foram gerados quando as moléculas foram fragmentadas seletivamente no QToF (modo *Product Ion*);

- Espectros de UV semelhantes foram obtidos para o ativo ramipril e as impurezas desconhecidas (Figuras 4.13, 4.14 e 4.15), sugerindo a não alteração de grupos cromóforos.

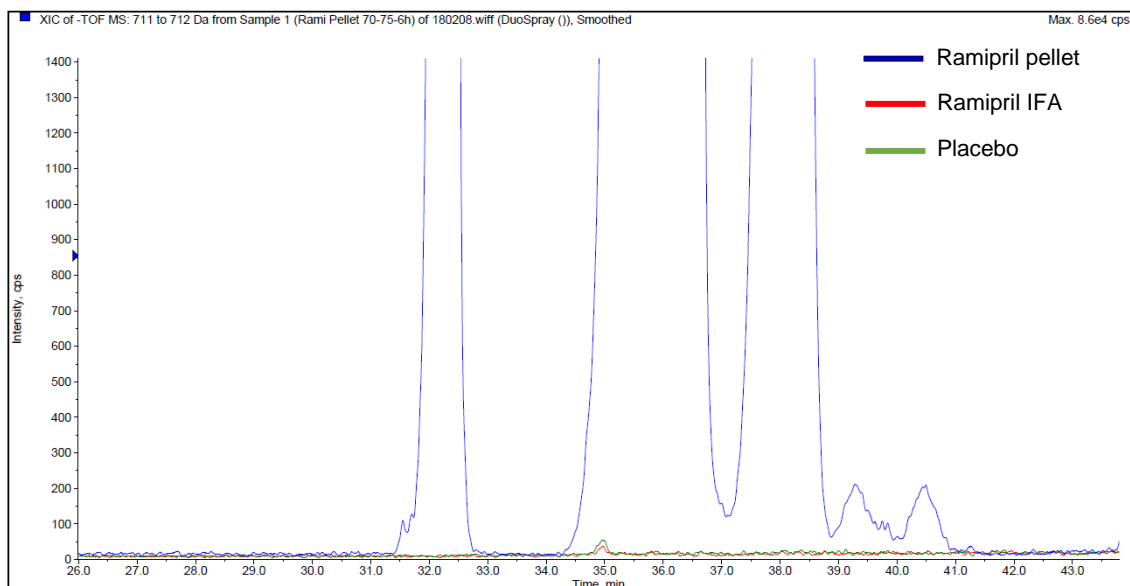


FIGURA 4.12. Comparação dos cromatogramas XIC em 711Da (modo negativo) de ramipril pellet (em azul), ramipril puro (em vermelho) e placebo de pellets (em verde) estressadas a 70°C, 75% U.R. por 6 horas.

As amostras foram analisadas no modo XIC com filtro de massas para 711Da. Uma vez verificada a não formação das impurezas no IFA isolado e no placebo de *pellets*, e considerando o fato da impureza possuir massa molecular maior do que o ramipril, sugere-se que a reação ocorre entre o ramipril e algum componente da formulação.

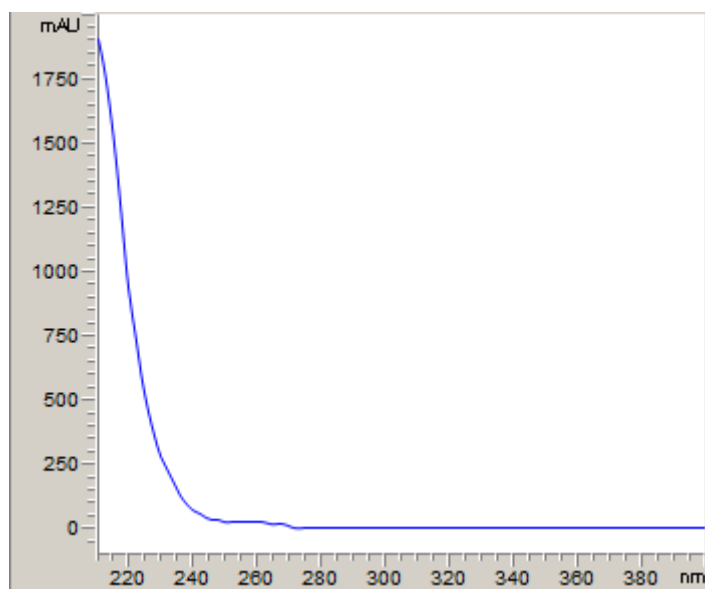


FIGURA 4.13. Espectro de absorção UV do ramipril.

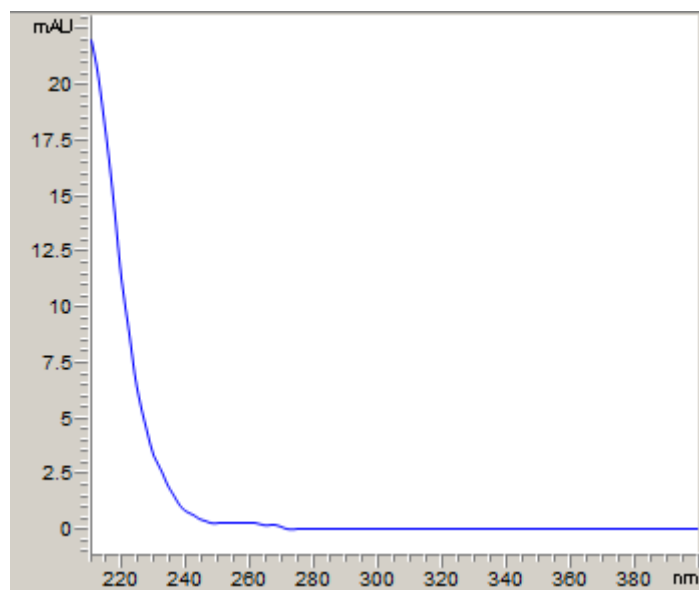


FIGURA 4.14. Espectro de absorção UV da impureza com tempo de retenção de 35,5 minutos.

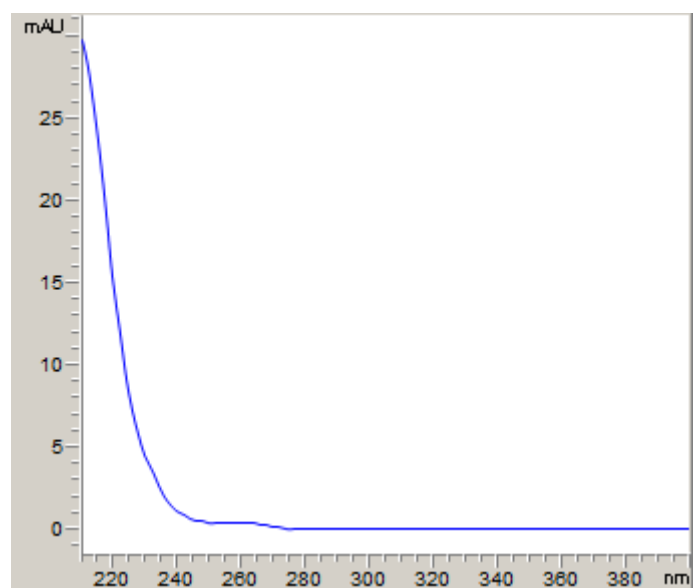


FIGURA 4.15. Espectro de absorção UV da impureza com tempo de retenção de 36,4 minutos.

Desta forma, analisou-se na molécula do ramipril os possíveis sítios nucleofílicos e eletrofílicos que permitiriam uma reação direta com outra estrutura (excipientes e/ou contaminantes dos excipientes). Verificou-se que o ramipril possui um sítio nucleofílico (amina secundária) e três sítios eletrofílicos (amida, éster e ácido carboxílico), conforme demonstrado na Figura 4.16.

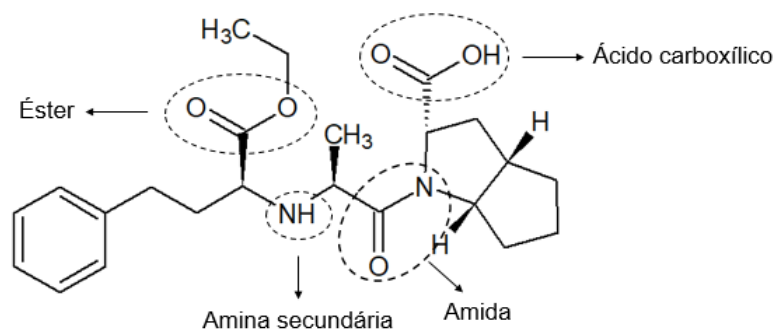


FIGURA 4.16. Regiões de eletrofilicidade e nucleofilicidade presentes no ramipril.

A avaliação teórica dos excipientes indica que a sacarose (Figura 4.17), por apresentar três álcoois primários, pode atuar como agente nucleofílico em substâncias com sítios eletrofílicos como os do ramipril. Os álcoois secundários presentes na estrutura apesar do caráter nucleofílico são menos reativos quando comparados com o álcool primário, devido ao impedimento estérico.

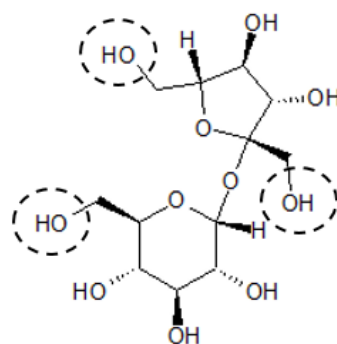


FIGURA 4.17. Estrutura molecular da sacarose e seus álcoois primários em destaque.

De acordo com a massa molecular da sacarose de 342,3g/mol e diante dessas informações, é possível propor mecanismos de reação baseados na transesterificação do grupamento éster do ramipril e do álcool primário da molécula de sacarose, com possível formação de três estruturas (Figura 4.18):

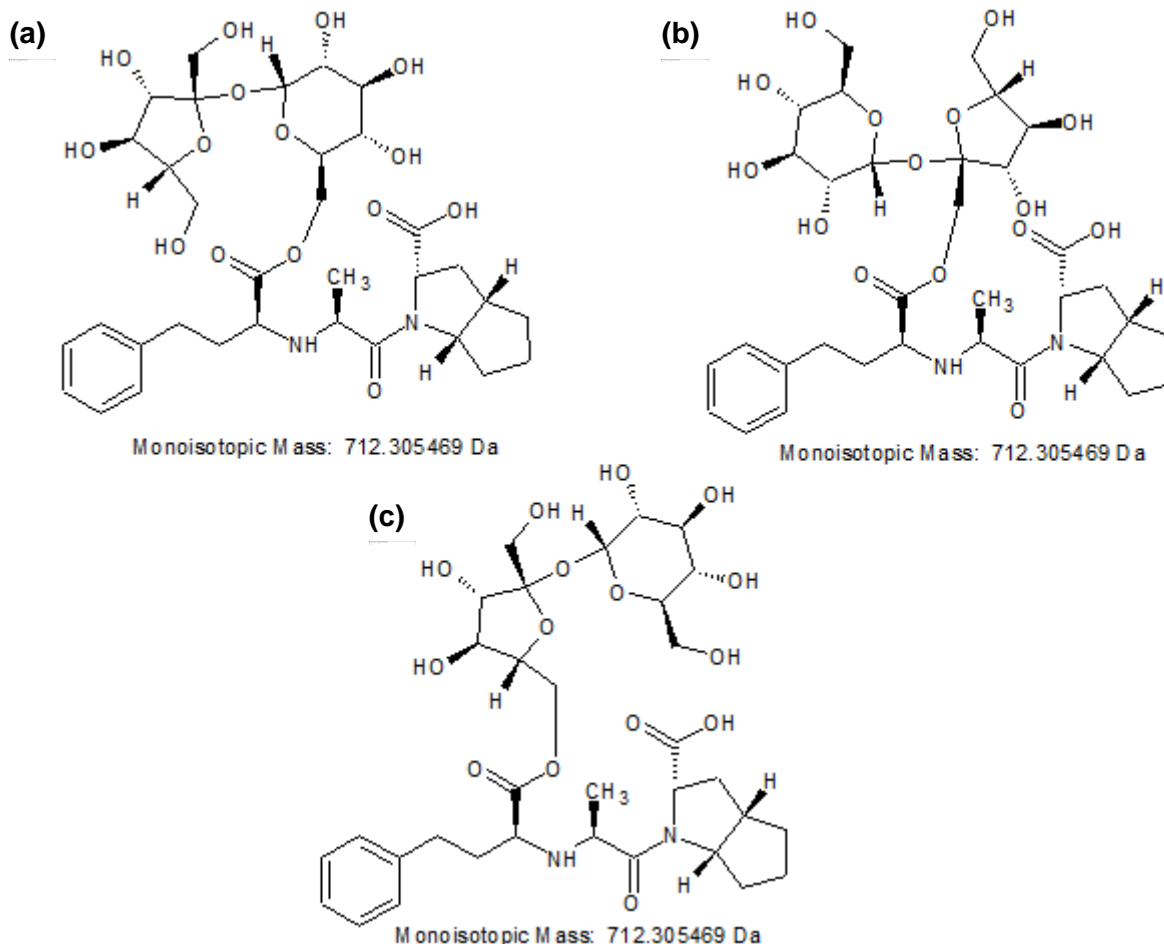


FIGURA 4.18. Estruturas geradas por reação de transesterificação entre uma molécula de ramipril e uma molécula de sacarose com (a) reação no sacarídeo glicose e (b) (c) reação no sacarídeo frutose.

De maneira geral, a transesterificação, também conhecida como alcoólise (Figura 4.19), consiste na reação entre um éster e um álcool, com formação de um novo éster e um novo álcool, catalisada por ácido ou base. Assim, uma molécula de ramipril (grupo éster) reage com uma molécula de sacarose (álcool primário) gerando uma das possíveis estruturas descritas acima como o novo éster (ramipril + sacarose) e uma molécula de etanol como o novo álcool.

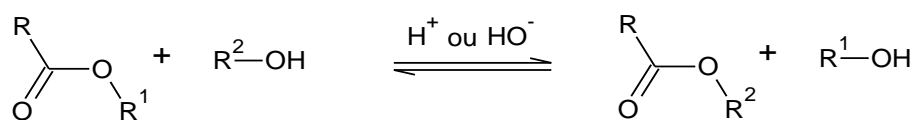


FIGURA 4.19. Reação geral de transesterificação.

Essa proposta é coerente e plausível não somente por conta dos dados apresentados, mas também por existirem dois picos com mesma massa molecular.

Diante do exposto, por fim, é possível apresentar uma proposta coerente de interpretação dos espectros apresentados na Figura 4.11 em que os picos observados correspondem ao ramipril ligado pela sacarose através das duas formas anoméricas da frutose (Figura 4.20).

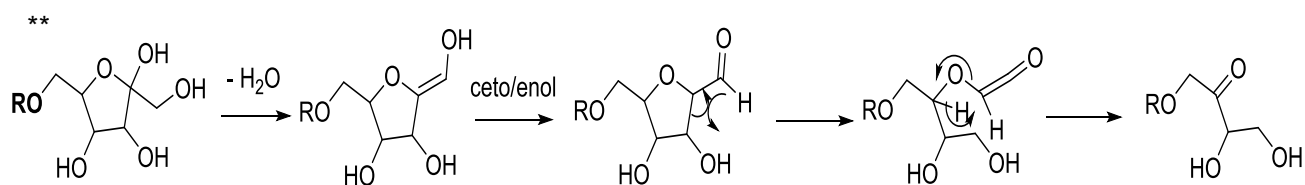
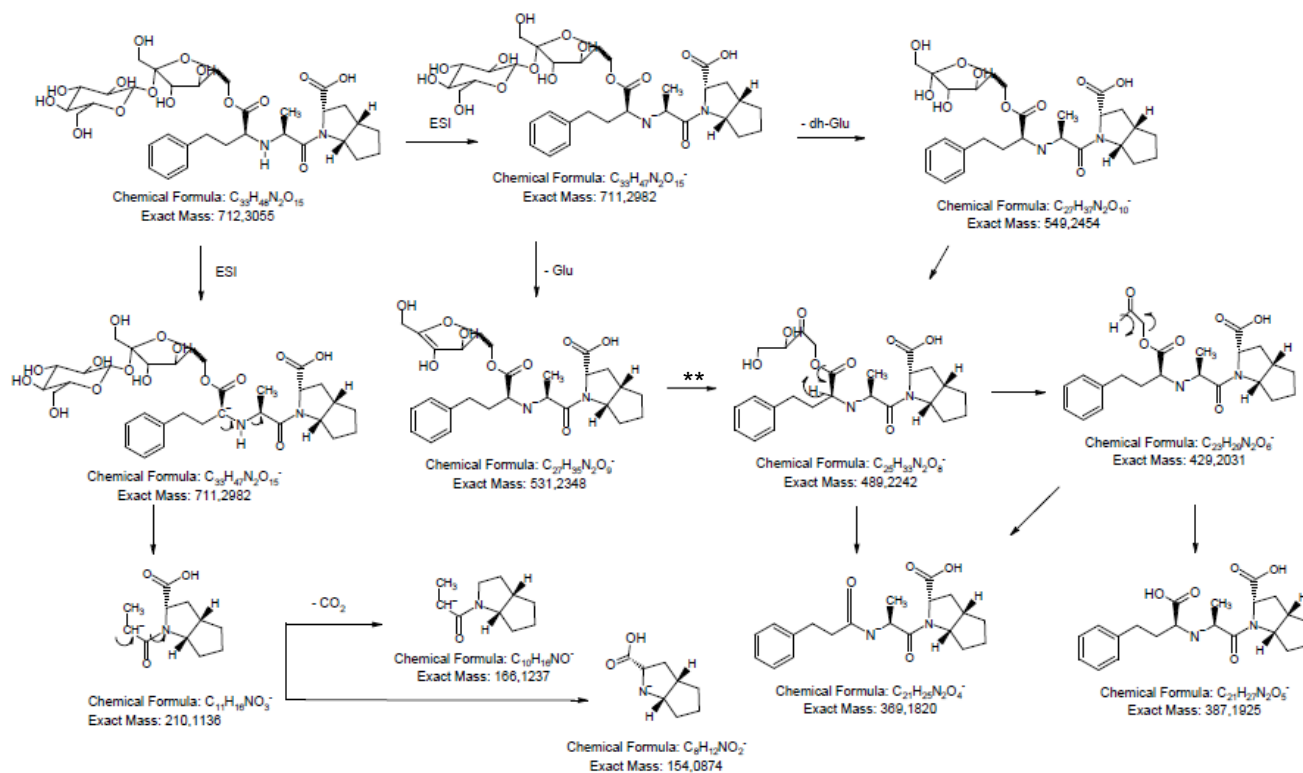


FIGURA 4.20. Proposta apresentada para a fragmentação das impurezas desconhecidas – ligação ocorrendo no sacarídeo frutose (representação da ligação sem estereoquímica).

Uma vez verificados picos menos intensos (Figura 4.21) com m/z 711Da pode-se propor estruturas minoritárias geradas através da reação entre o ramipril e os álcoois secundários da frutose (menos reativos em relação aos álcoois primários) uma vez que o padrão de fragmentação observado para estes picos (Figura 4.22) estão em concordância com a fragmentação proposta para as impurezas majoritárias.

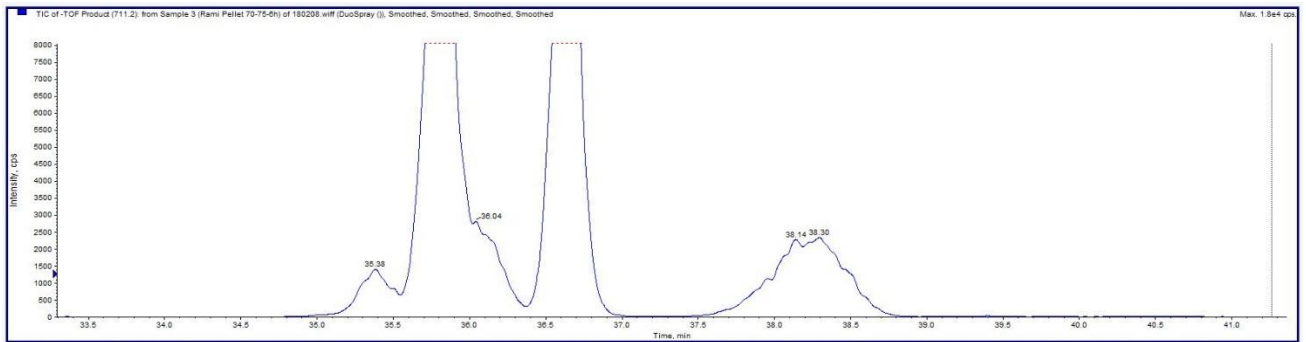


FIGURA 4.21. Cromatograma XIC da massa 711Da (modo negativo) da amostra de ramipril pellet estressada (destaque para os picos minoritários em 35,38, 36,04 e 38,30 minutos).

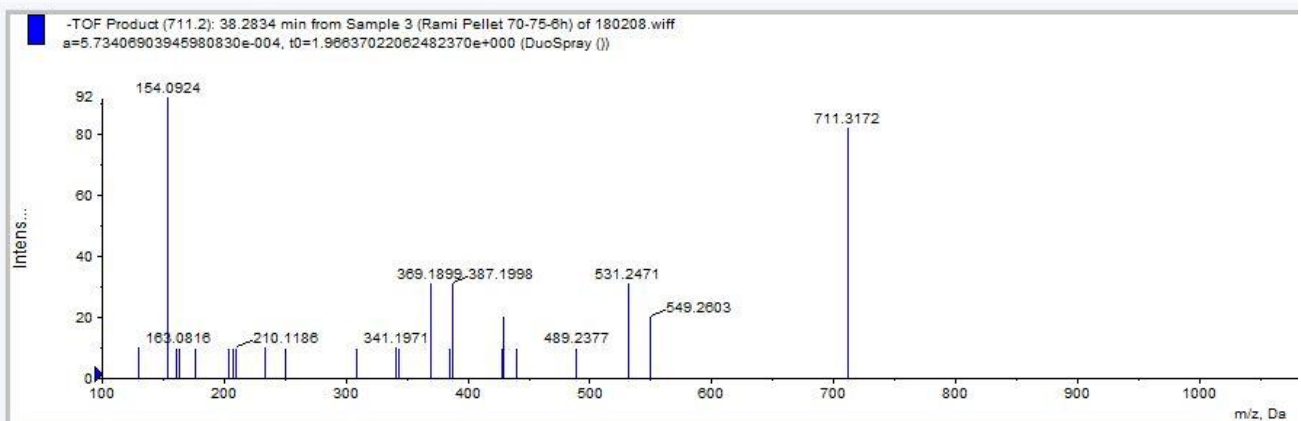
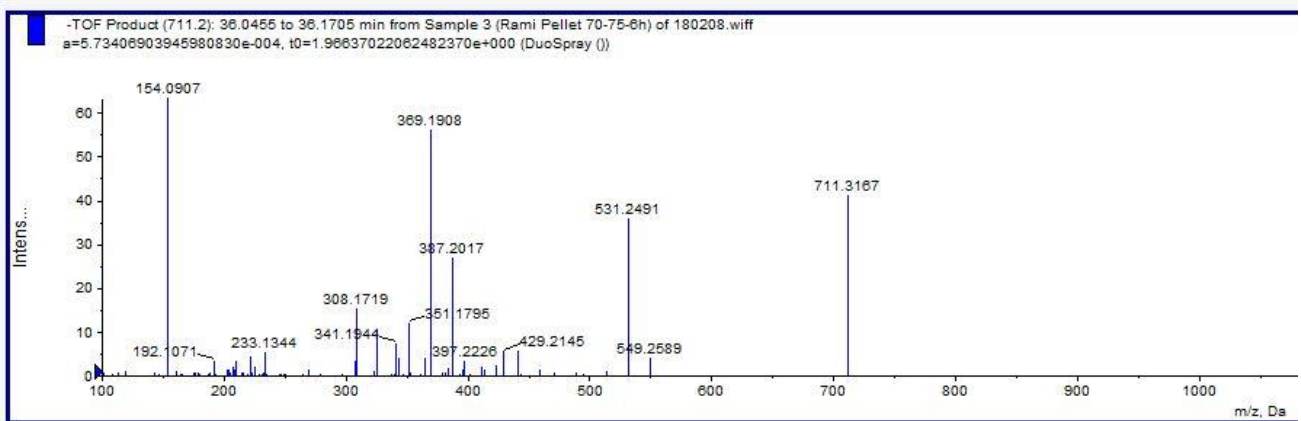
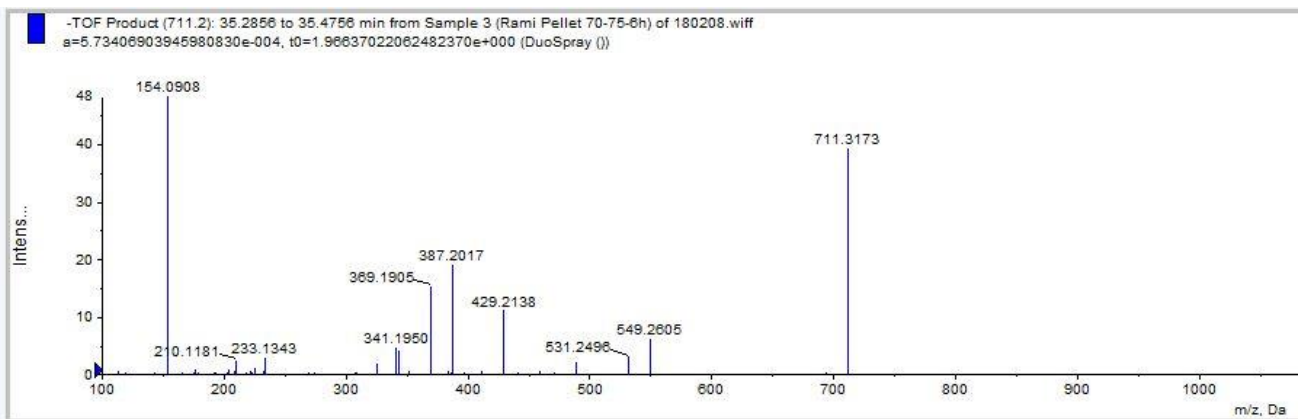


FIGURA 4.22. Padrão de fragmentação obtido para o (a) pico em 35,38 minutos, para o (b) pico em 36,04 minutos e para o (c) pico em 38,30 minutos.

4.4. DETERMINAÇÃO DE MASSA EXATA DAS IMPUREZAS

A determinação da massa exata de uma molécula desconhecida faz com que a estrutura química a ser proposta seja obtida com maior confiança. De acordo com o cálculo abaixo pode-se determinar experimentalmente o desvio de massa em partes por milhão (ppm).

$$\text{Desvio de massa (ppm)} = \left| \frac{\frac{m}{z} \text{ teórico} - \frac{m}{z} \text{ obtido}}{\frac{m}{z} \text{ teórico}} * 10^6 \right|$$

De acordo com os valores de m/z obtidos experimentalmente (Figura 4.5) e os valores de massas monoisotópicas do ramipril e das estruturas propostas os valores de desvio de massa podem ser visualizados abaixo (Tabela 4.1).

TABELA 4.1. Cálculo de desvio de massa para as impurezas desconhecidas.

Analito	Massa exata (Da)	m/z experimental	Desvio de massa (ppm)
Ramipril	415.223846	415.2275	8.80
Pico 1 (35,5min)	711.298192	711.3047	9.15
Pico 2 (36,4min)	711.298192	711.3045	8.87

Os valores de desvio de massa obtidos estão bastante satisfatórios, sugerindo que as estruturas propostas estão em concordância, uma vez que o defeito de massa se reproduz para o ramipril, substância conhecida. Vale ressaltar que o sistema foi previamente calibrado.

4.5. ELUCIDAÇÃO POR LC-SPE-RMN

Uma vez que a análise por RMN exige solventes deuterados, foi necessário fracionar os picos obtidos pela separação cromatográfica, concentrá-los utilizando extração em fase sólida online (SPE online) e ressuspendê-los em metanol deuterado. No entanto, devido à baixa concentração das substâncias, o procedimento ainda não foi capaz de proporcionar uma caracterização inequívoca utilizando a técnica.

Foram realizadas 70 injeções para obtenção das substâncias de interesse em quantidade suficientes para realizar os experimentos de RMN. Os cromatogramas a seguir (Figuras 4.23 e 4.24) mostram os dois (2) picos isolados para obtenção dos espectros de RMN 1D e 2D.

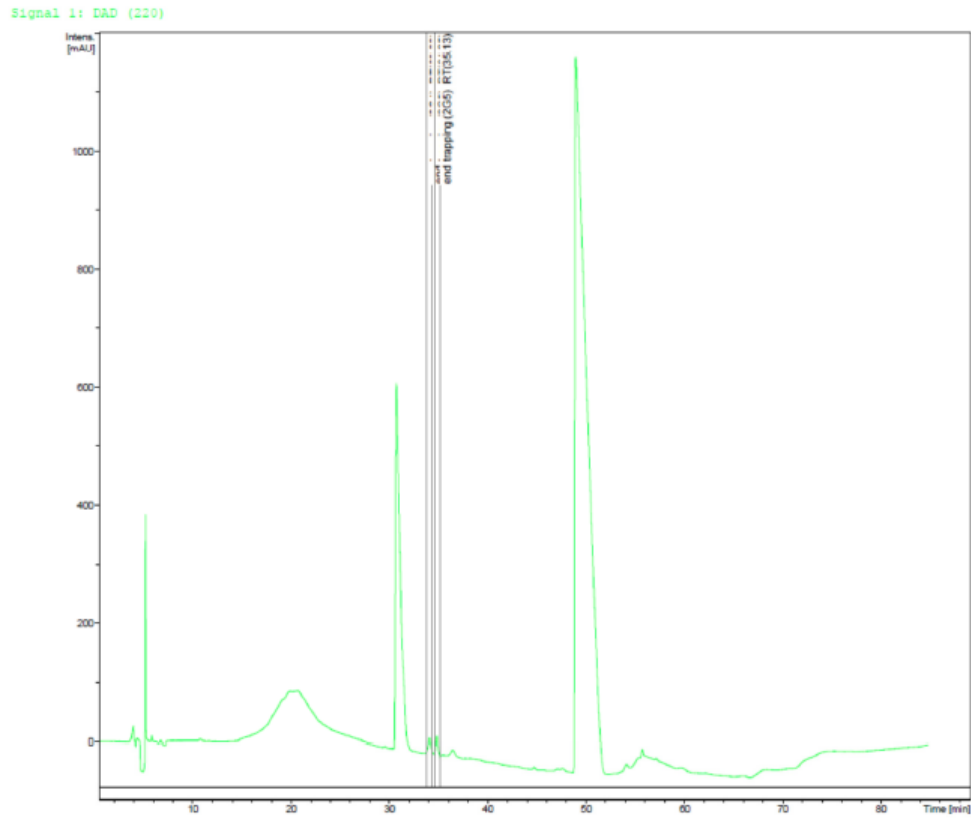


FIGURA 4.23. Cromatograma UV (220nm) evidenciando os picos 1 e 2 separados no modo "time slice".

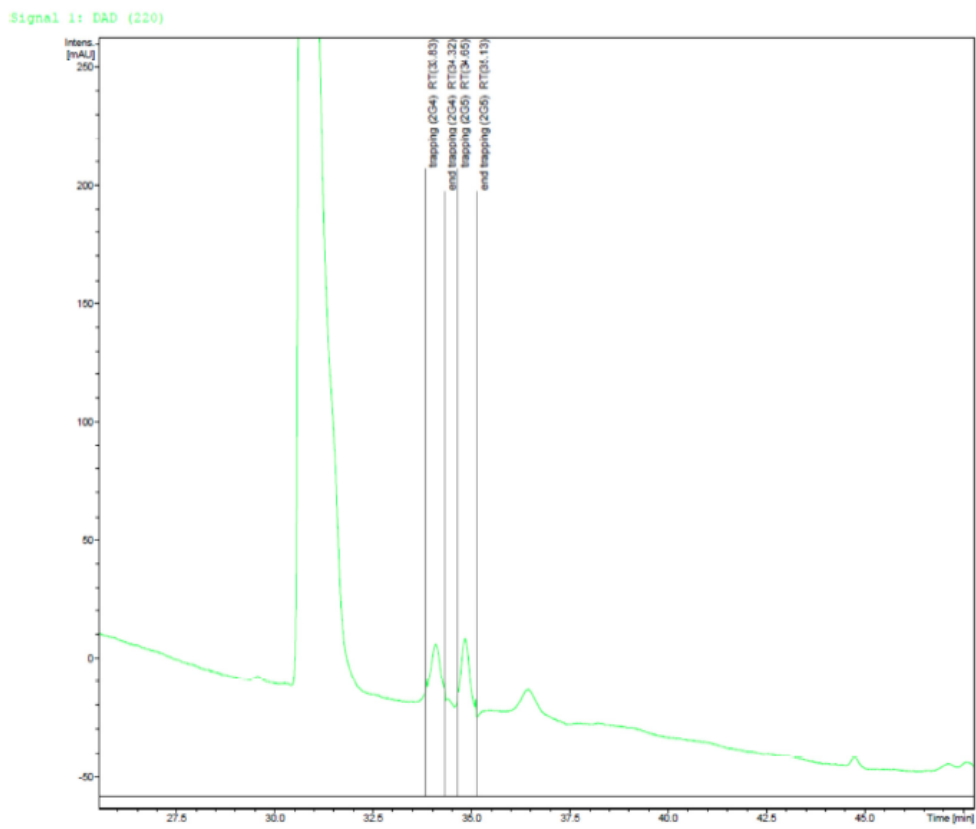


FIGURA 4.24. Cromatograma UV (220nm) evidenciando os picos 1 e 2 separados no modo "time slice" – Ampliação 1.

Os dois picos foram separados no modo *time slice* e nomeados como banda 1 - b1 e banda 2 - b2. As substâncias de interesse foram coletadas e separadas conforme mostrado na Tabela 4.2.

TABELA 4.2. Tempos de coleta dos picos de impurezas separados no modo "time slice".

Bandas	Intervalo de tempo (min)	
b1	33,83	34,42
b2	34,65	35,24

As amostras foram retiradas dos cartuchos, agrupadas, secas em nitrogênio gasoso e dissolvidas em CD₃OD (metanol deuterado). Devido à baixa quantidade de amostra concentrada na unidade SPE e, principalmente à presença de misturas e/ou impurezas, não foi possível fazer a atribuição inequívoca das substâncias isoladas tanto para o pico 1 quanto para o pico 2, mas somente constatou-se a presença de estruturas parciais presentes nas frações. Além disso, foi possível obter os espectros de RMN de ¹H (Figuras 4.25 a 4.30), e mapas de contorno HSQC (Figuras 4.31 a 4.38).

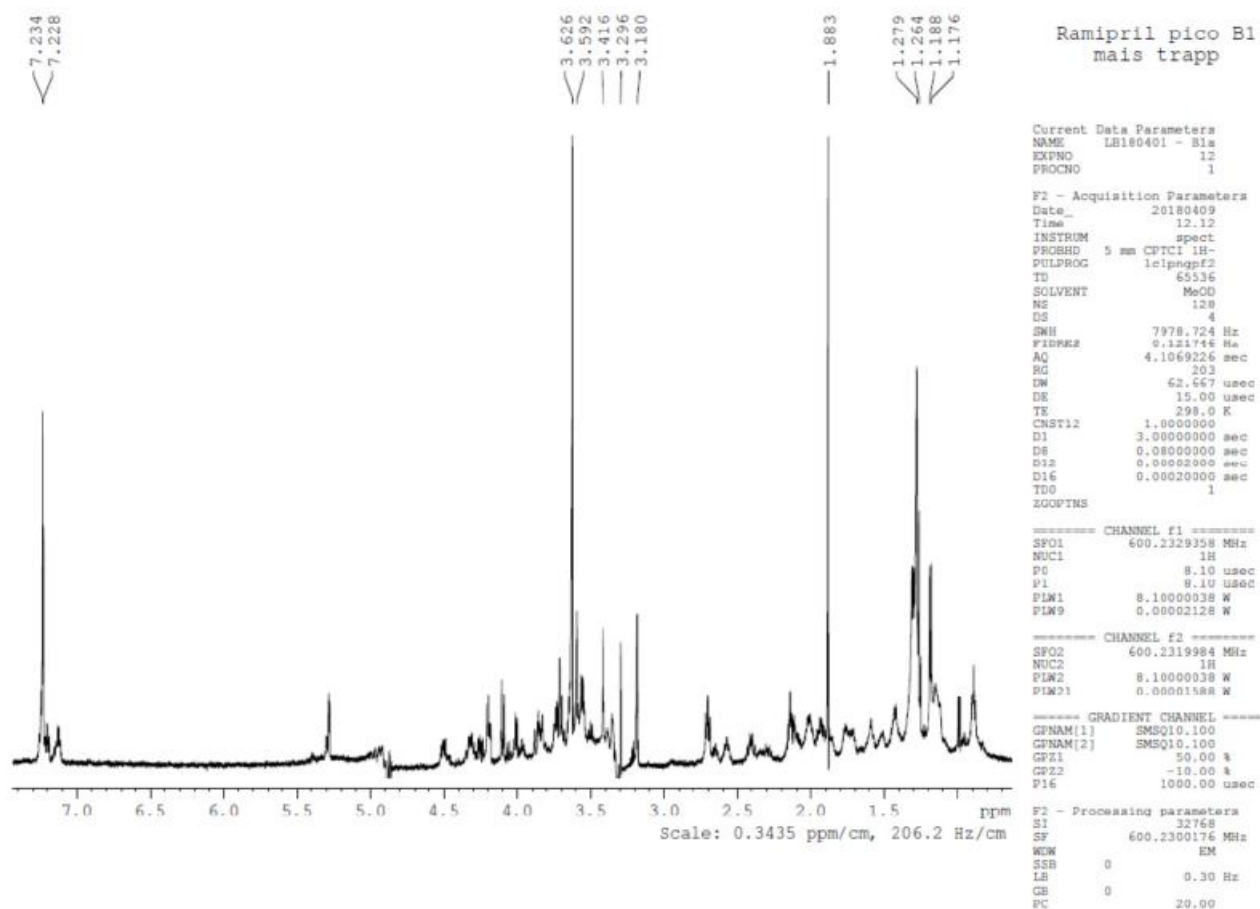


FIGURA 4.25. Espectro de RMN de ¹H para o pico 1 – b1 em CD₃OD.

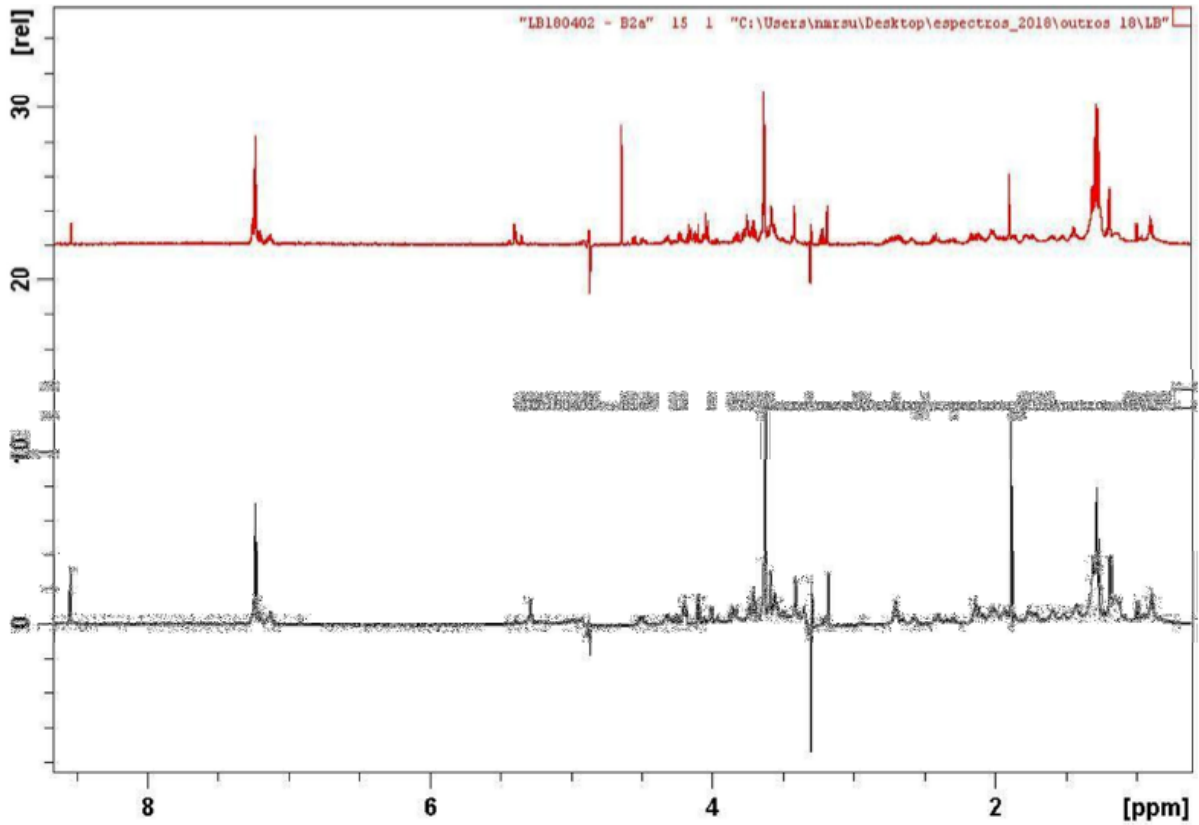


FIGURA 4.26. Espectros de RMN de ¹H para os picos 1 – b1 (inferior) e 2 – b2 (superior) em CD₃OD.

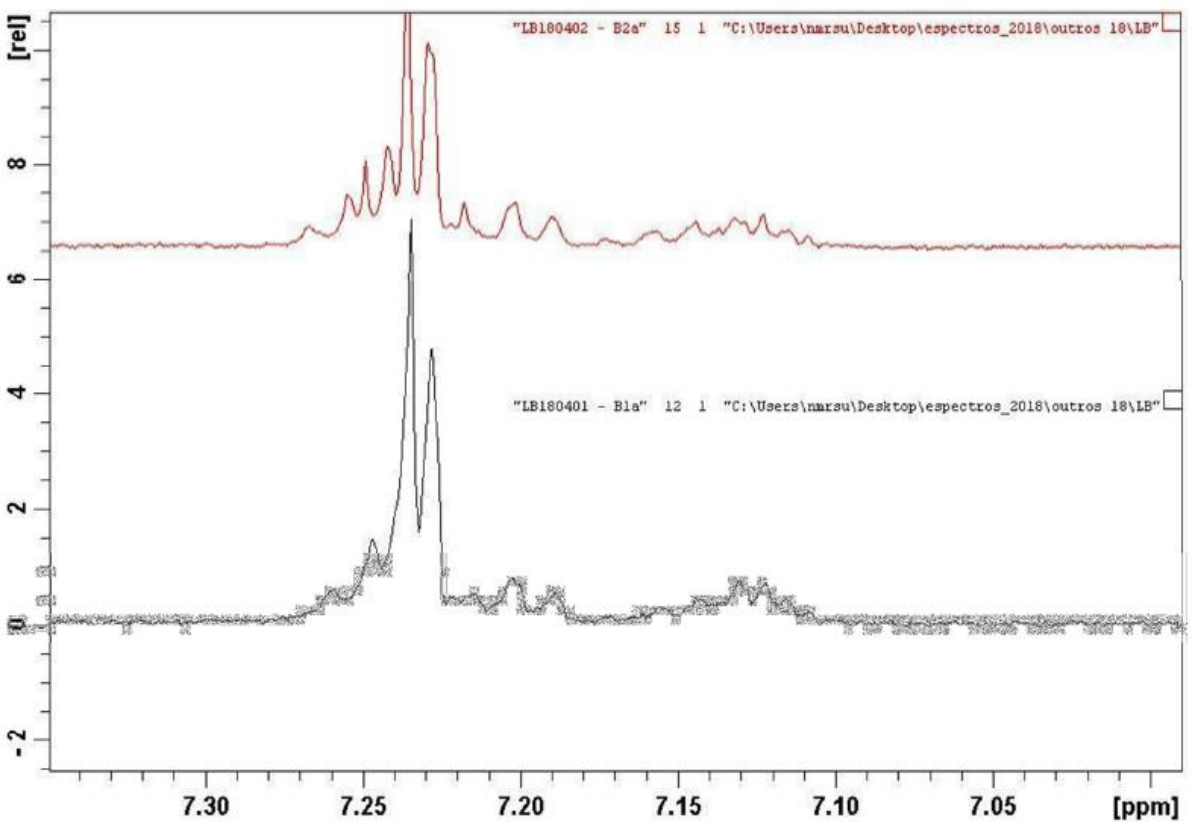


FIGURA 4.27. Espectros de RMN de ¹H para os picos 1 – b1 (inferior) e 2 – b2 (superior) em CD₃OD. Ampliação – Parte 1.

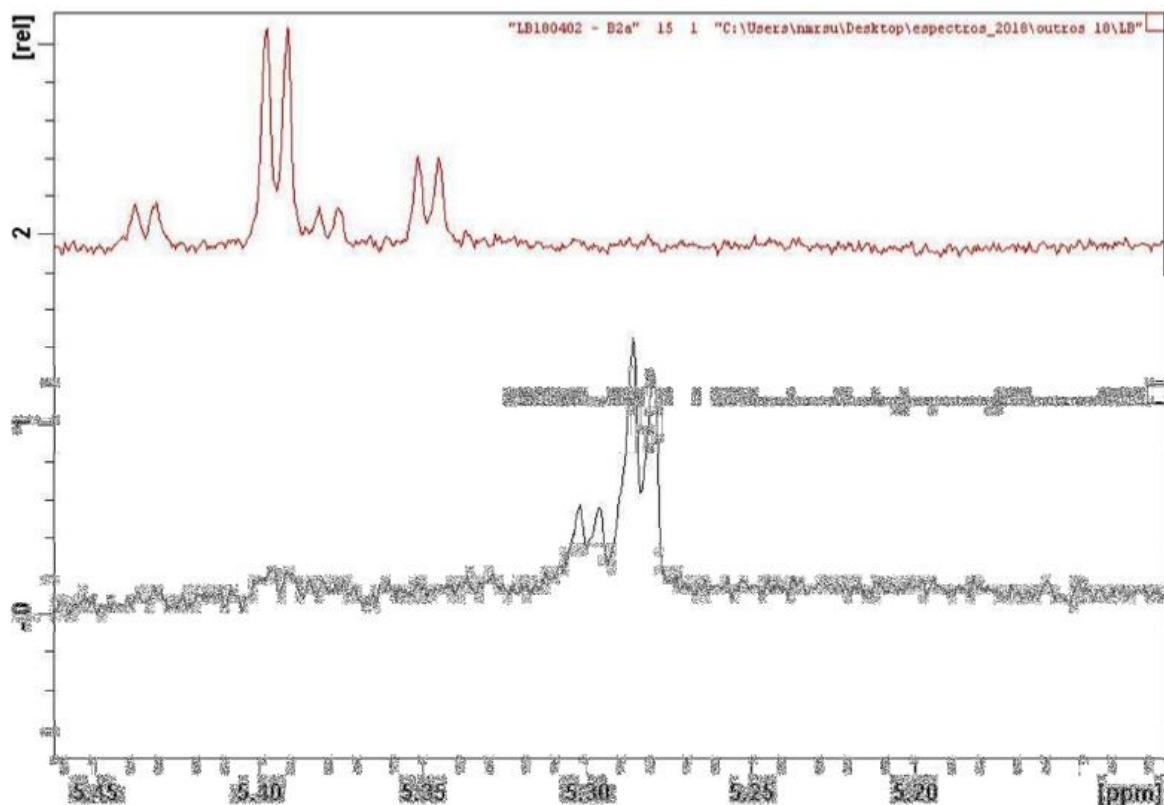


FIGURA 4.28. Espectros de RMN de ^1H para os picos 1 – b1 (inferior) e 2 – b2 (superior) em CD_3OD . Ampliação – Parte 2.

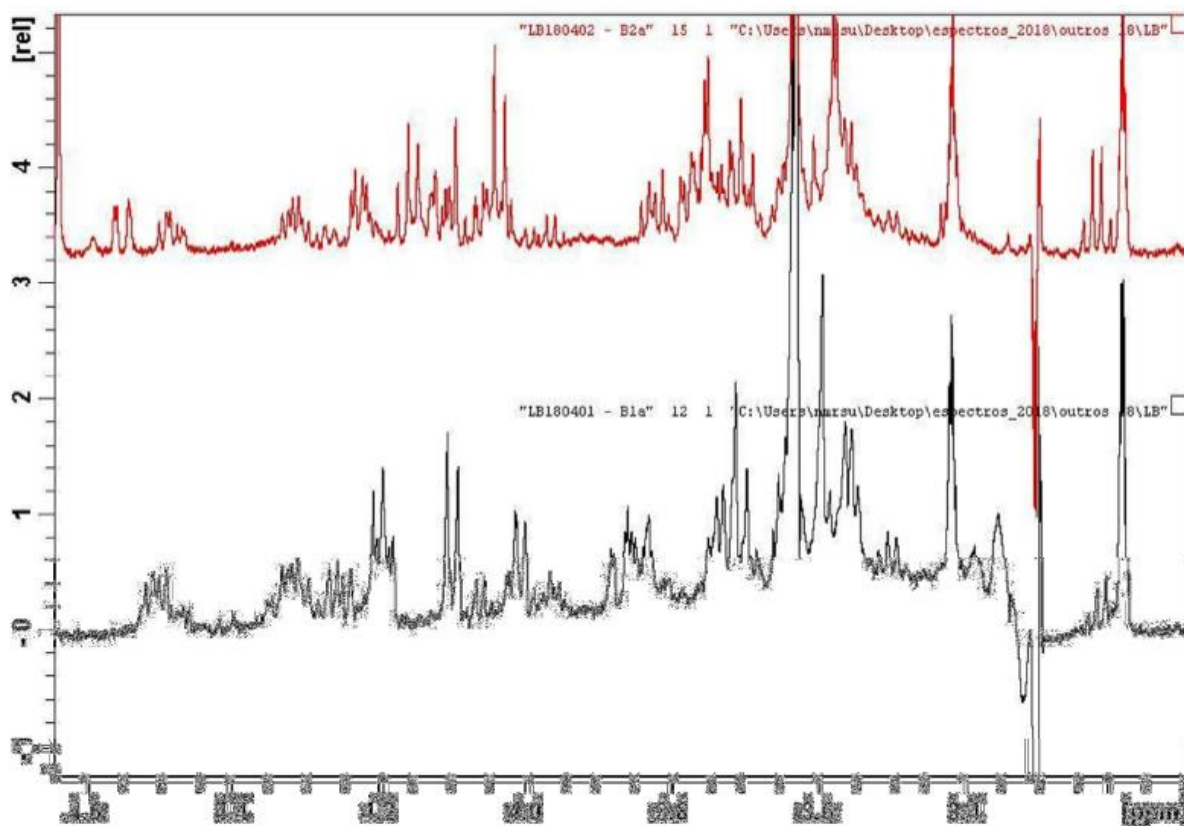


FIGURA 4.29. Espectros de RMN de ^1H para os picos 1 – b1 (inferior) e 2 – b2 (superior) em CD_3OD . Ampliação – Parte 3.

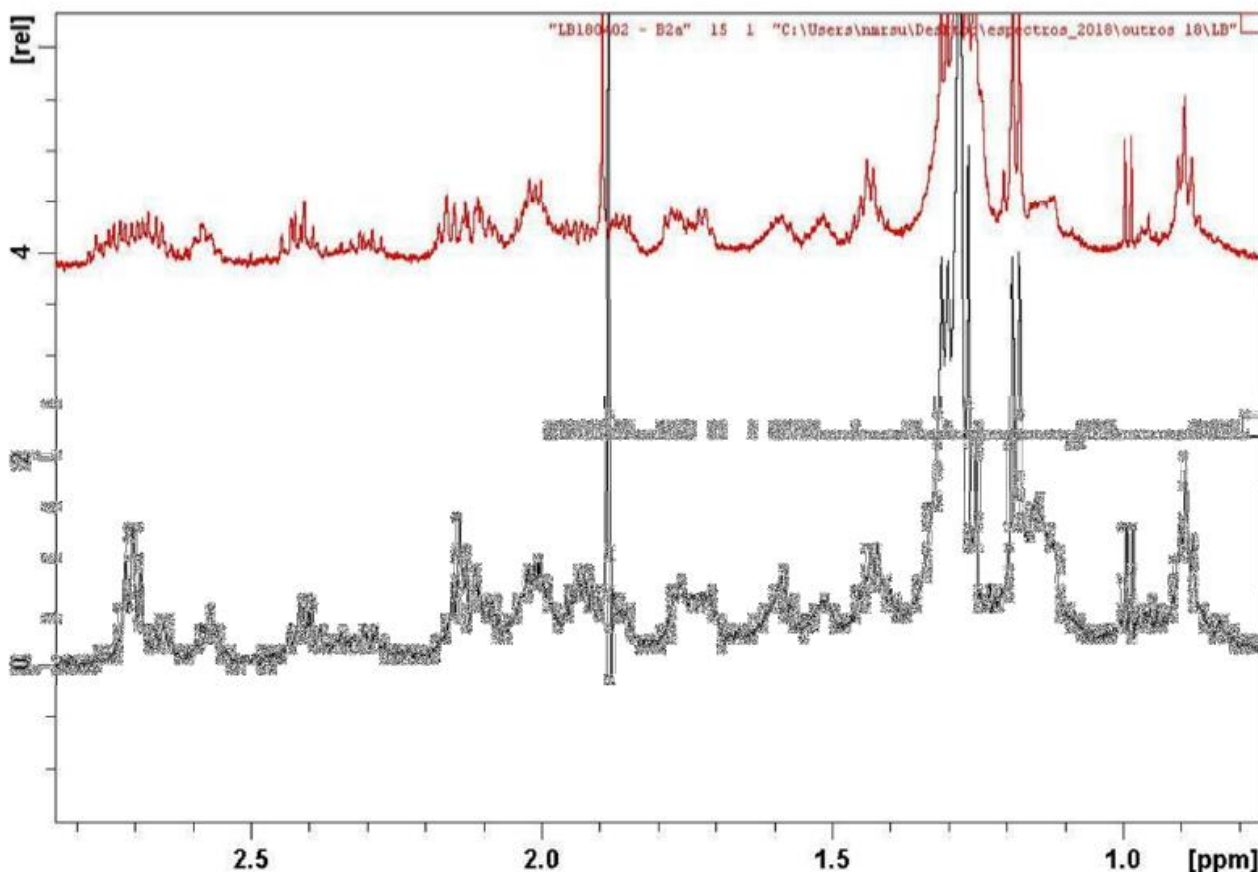


FIGURA 4.30. Espectros de RMN de ^1H para os picos 1 – b1 (inferior) e 2 – b2 (superior) em CD_3OD . Ampliação – Parte 4.

No espectro de RMN ^1H é observado um duplete em 5.39ppm com constante de acoplamento de 3.85Hz. Este sinal ainda se correlaciona com um carbono em 93.2ppm, observado nos espectros HSQC apresentados a seguir (Figuras 4.31 a 4.36). Tanto o deslocamento químico do hidrogênio quanto o do carbono são típicos de uma unidade α -glicosídica. A constante de acoplamento ainda é compatível com hidrogênios na posição alfa. Aliado a estes pontos, a avaliação dos valores de deslocamentos químicos de ^{13}C para a sacarose e a comparação com os sinais dos carbonos metilênicos, deve confirmar que o ramipril se ligou a um dos metilenos da frutose e que a frutose, por estar presente nas suas duas formas anoméricas condiz com a observação de dois compostos majoritários (Figura 4.37).

Ramipril pico B1
mais trapp

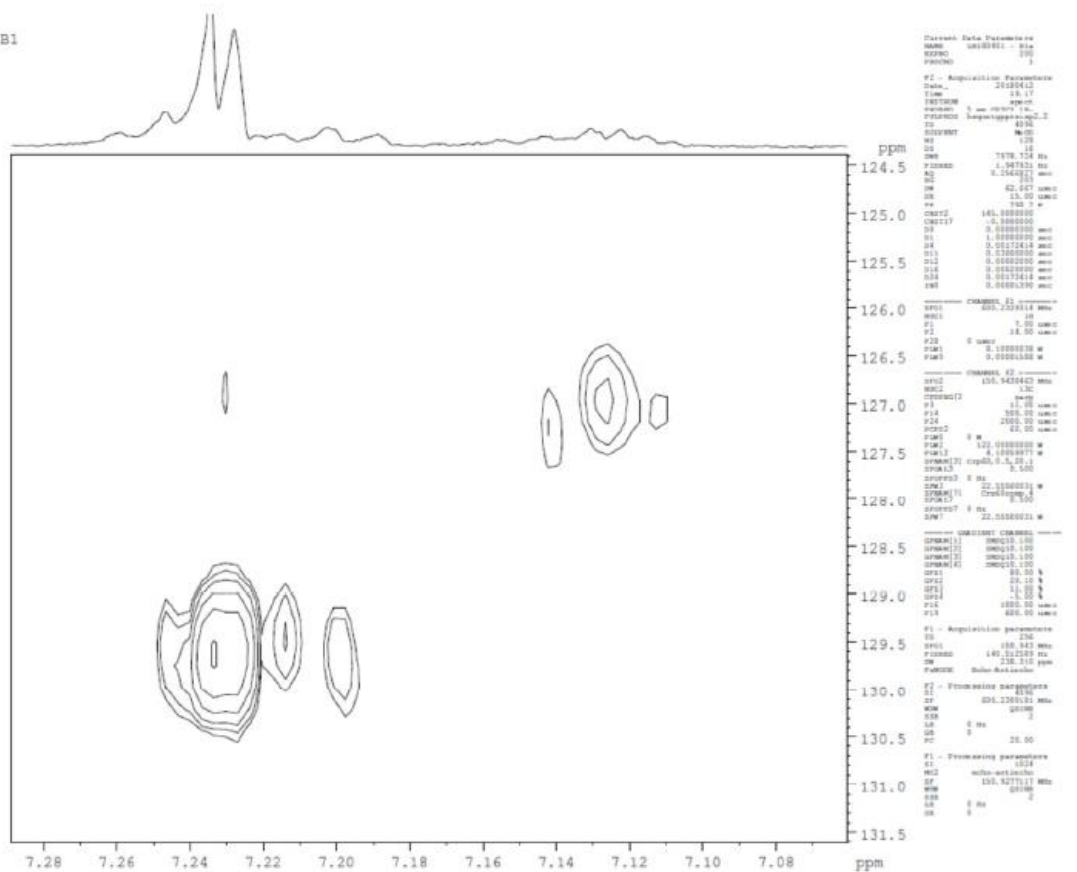


FIGURA 4.31. Mapa de contorno HSQC para o pico 1 – b1 em CD₃OD – Ampliação 1.

Ramipril pico B1
mais trapp

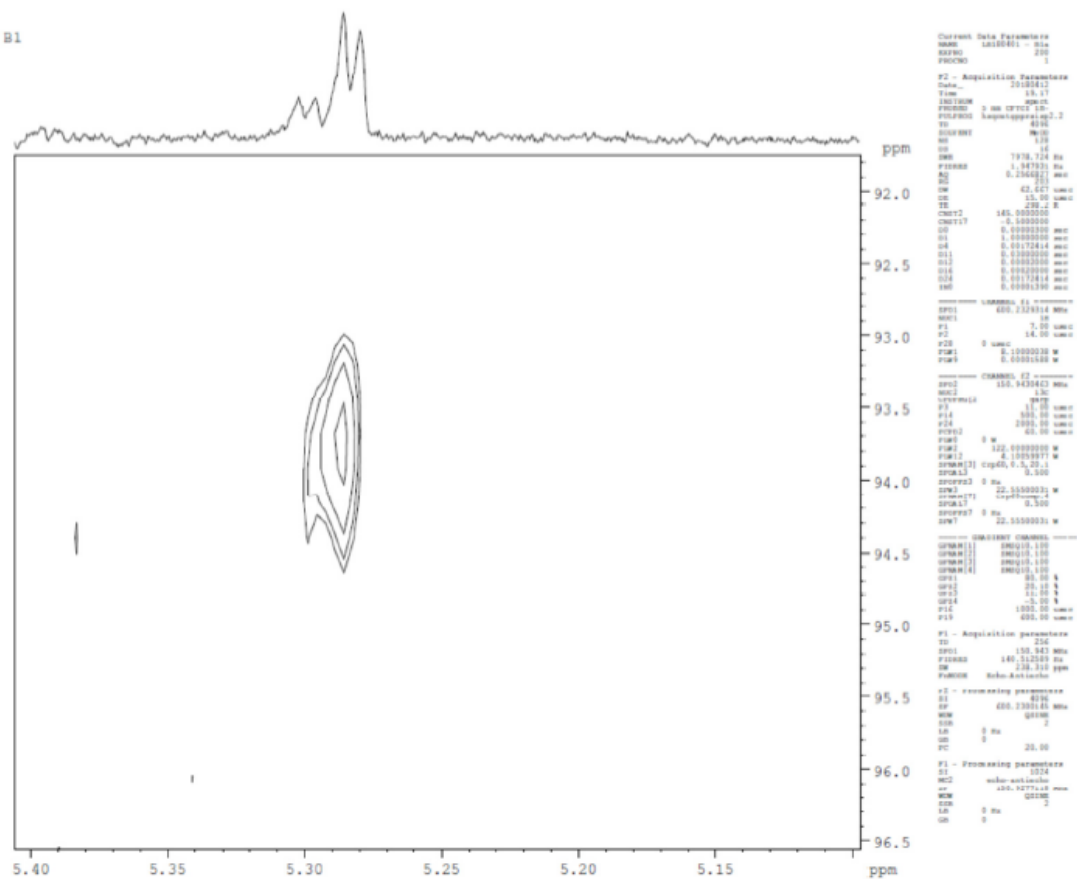


FIGURA 4.32. Mapa de contorno HSQC para o pico 1 – b1 em CD₃OD – Ampliação 2.

Ramipril pico B1
mais trapp

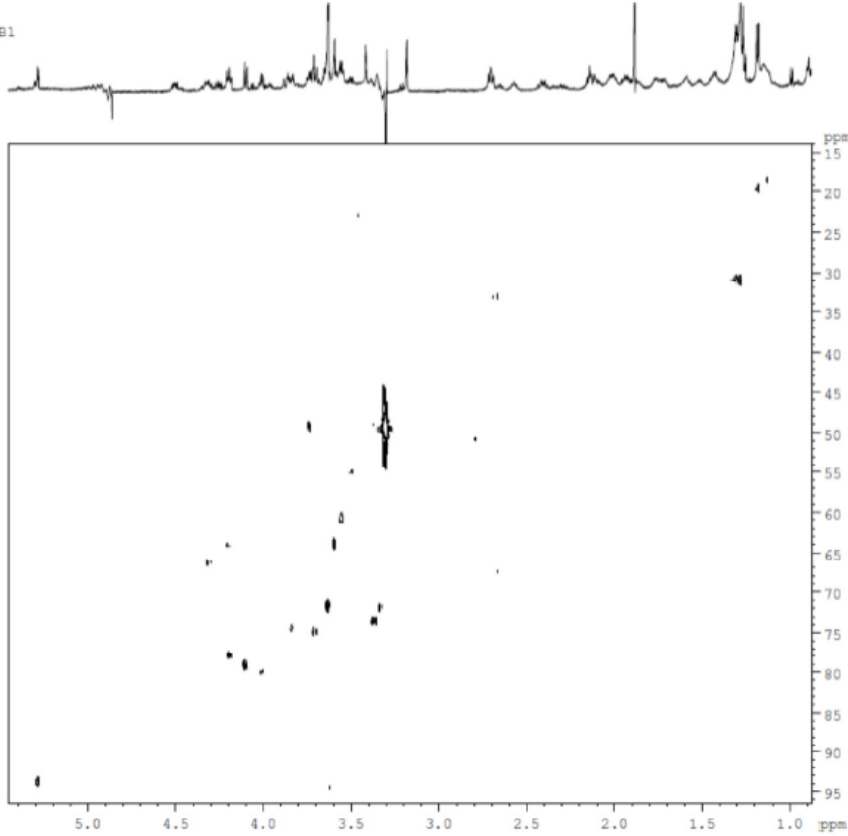


FIGURA 4.33. Mapa de contorno HSQC para o pico 1 – b1 em CD₃OD – Ampliação 3.

Ramipril pico B2
mais trapp

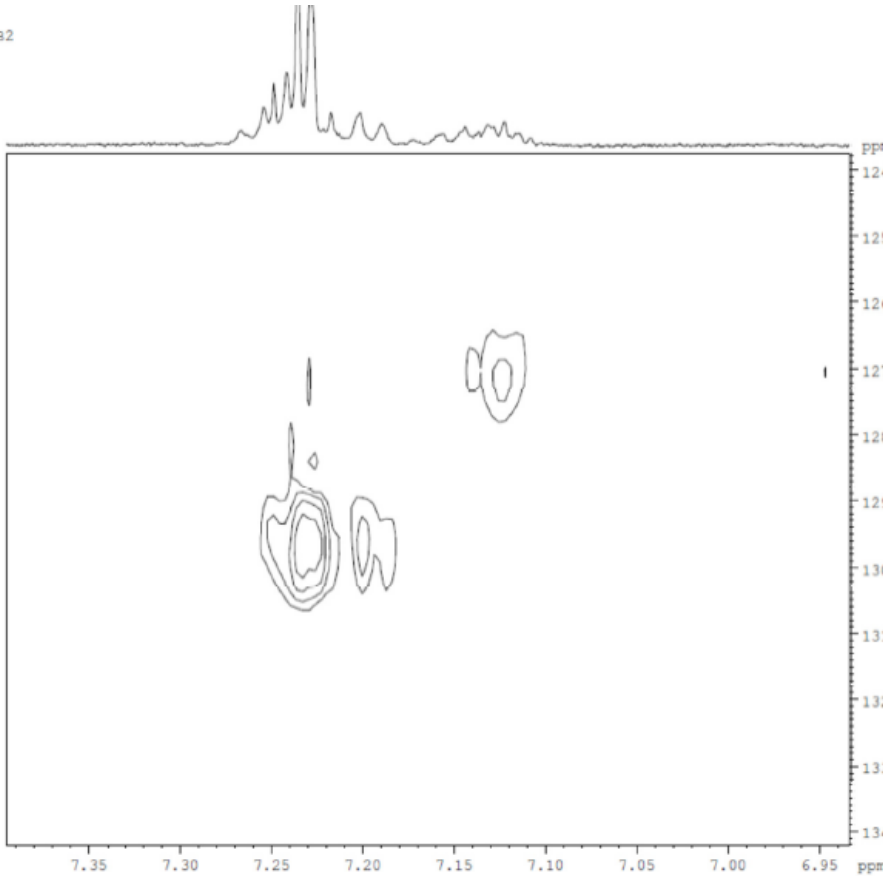


FIGURA 4.34. Mapa de contorno HSQC para o pico 2 – b2 em CD₃OD – Ampliação 1.

Ramipril pico B2
mais trapp

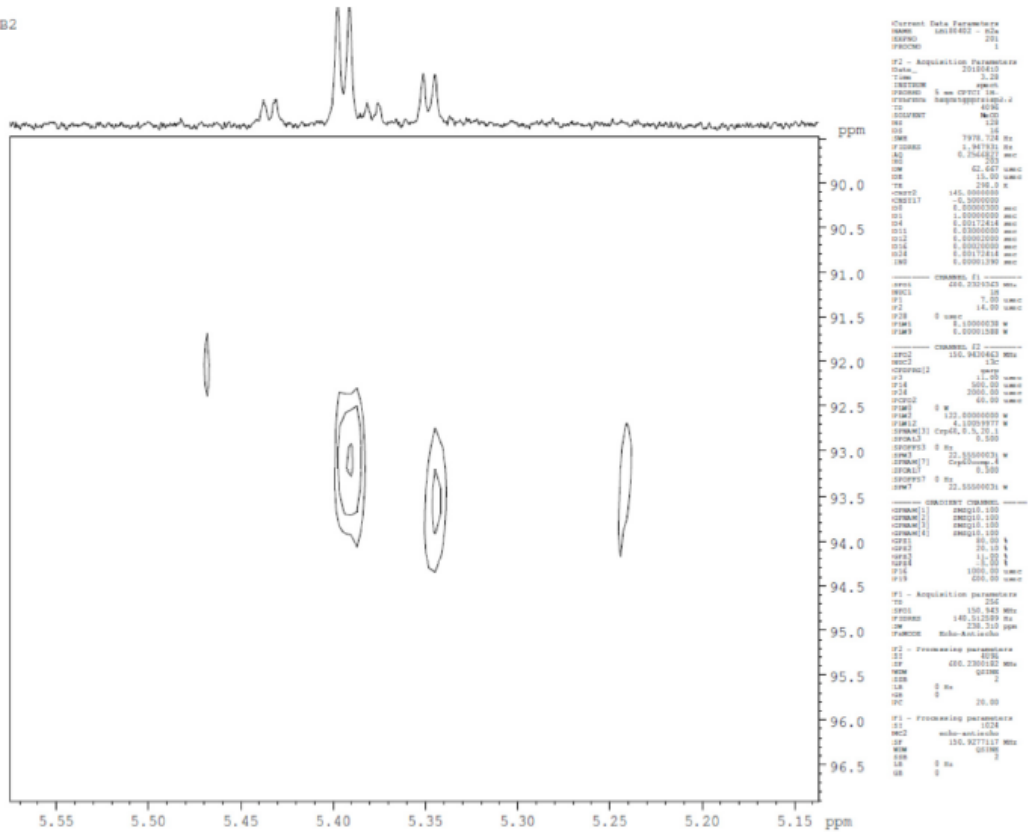


FIGURA 4.35. Mapa de contorno HSQC para o pico 2 – b2 em CD₃OD – Ampliação 2.

Ramipril pico B2
mais trapp

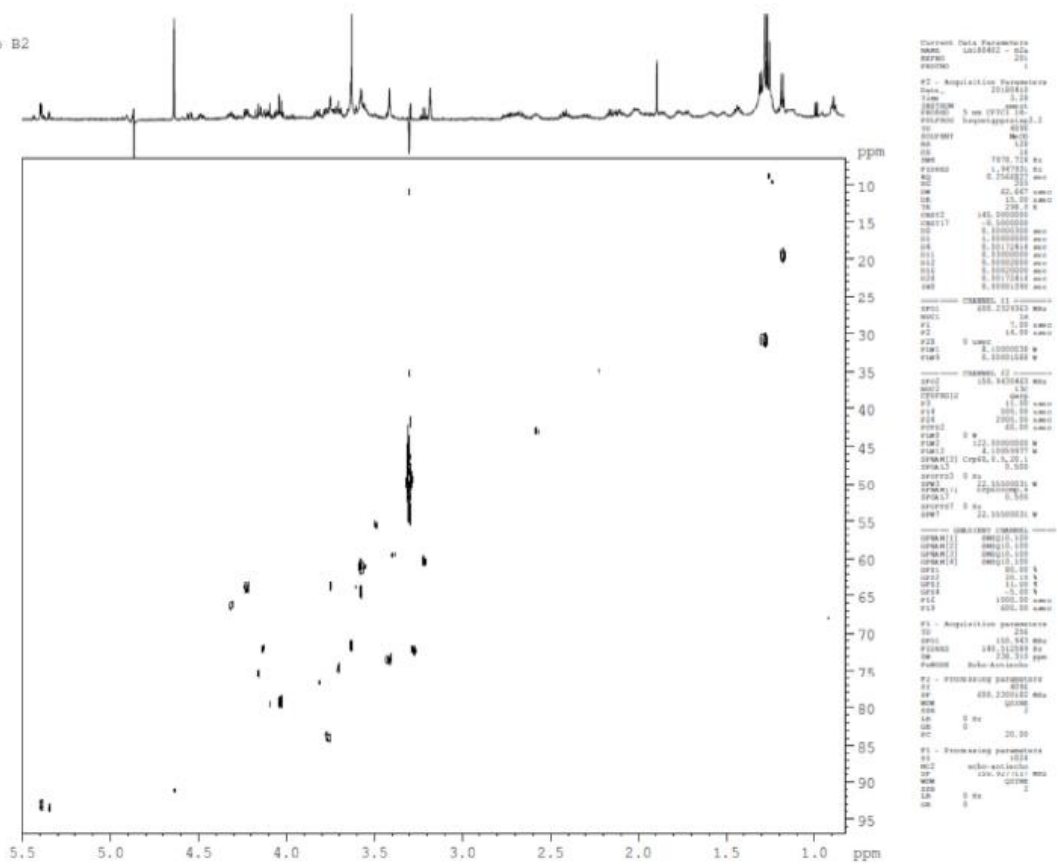
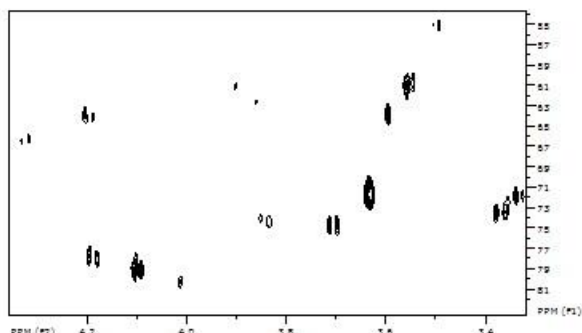
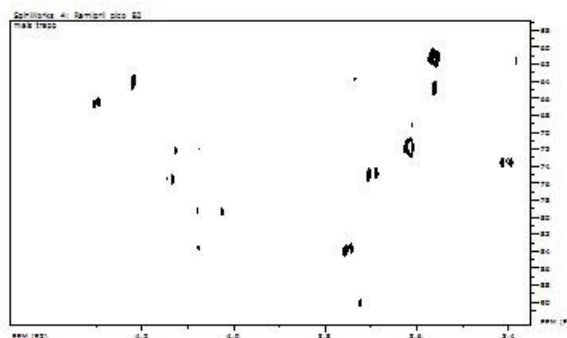


FIGURA 4.36. Mapa de contorno HSQC para o pico 2 – b2 em CD₃OD – Ampliação 3.

HQSC – Impureza 1



HQSC – Impureza 2



Peak #	FREQUENCY [Hz]	INTENSITY [PPM]
1	10700.879	106.3573
2	9542.797	94.8470
3	8456.364	84.0488
4	7972.468	79.2393
5	7724.588	76.7756
6	7579.442	75.3330
7	7556.326	75.1032
8	7425.701	73.8049
9	7242.073	71.9798
10	6548.308	65.0844
11	6453.203	64.1392
12	6327.044	62.8853

Sucrose (HMDB00258)

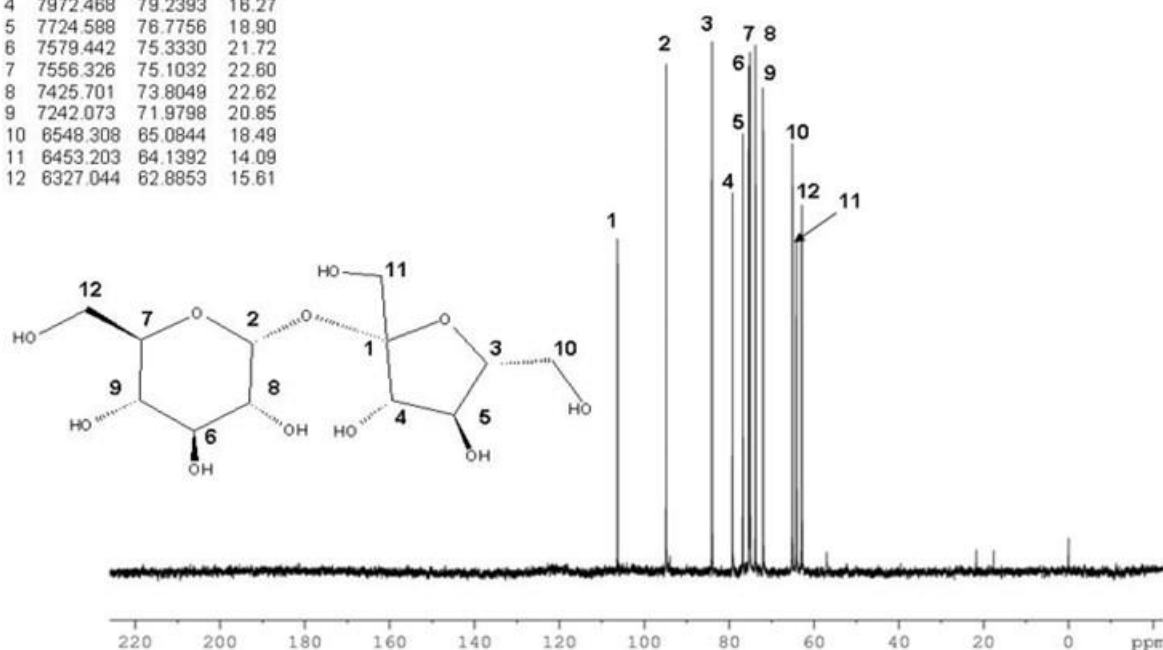


FIGURA 4.37. Espectro de ^{13}C de sacarose e mapas de contorno HQSC (região ampliada das Figuras 4.31 e 4.34) das impurezas.

No mapa de contorno DOSY (Figura 4.38) ainda observa-se que os sinais relativos à unidade α -glicosídica apresentam a mesma difusão de outros hidrogênios na região dos aromáticos e da região dos alifáticos (linha 1). Na linha 2 observa-se correlação dos sinais de possíveis contaminantes alifáticos e, na linha 3 os sinais correspondentes ao solvente (metanol) e água com troca química presente na amostra/solvente (HDO).

Ramipril pico B2
mais trapp

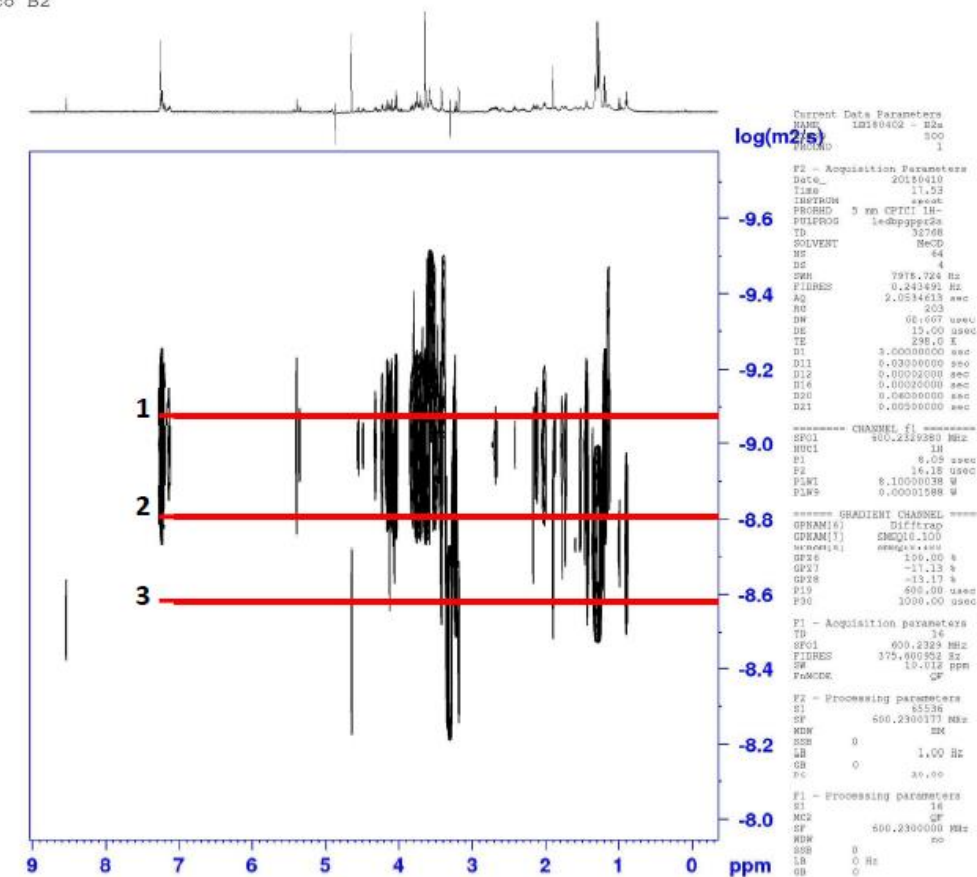


FIGURA 4.38. Mapa de contorno DOSY para o pico 2 – b2 em CD₃OD.

Todas essas informações levam a uma proposta de uma estrutura α -glicosilada, o que é compatível com uma conformação assumida pelo anel glicosídico mantendo o grupo mais volumoso ligado ao carbono anomérico na posição equatorial. Essa proposta de estrutura é condizente com a obtida na elucidação por LC-MS/MS.

4.6. AVALIAÇÃO IN-SILICO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO

As predições realizadas (Figuras 4.39 a 4.42) apontaram potencial mutagênico negativo em ambos os softwares para todos os produtos de degradação considerados.

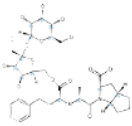


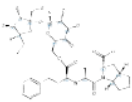


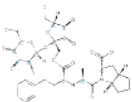


Classification Table							
Structure	Derek Prediction	Sarah Prediction	QSAR Prediction	Experimental Data	Similarity to API	ICH M7 Class	Comments
 Structure-2				Carc: Unspecified Ames: Unspecified	No Derek Alerts found	Class 5	
 Structure-3				Carc: Unspecified Ames: Unspecified	No Derek Alerts found	Class 5	
 Structure-4				Carc: Unspecified Ames: Unspecified	No Derek Alerts found	Class 5	

FIGURA 4.39. Avaliação de mutagenicidade (Derek e Sarah) e classificação segundo ICH M7.

Classification Card - Structure-2

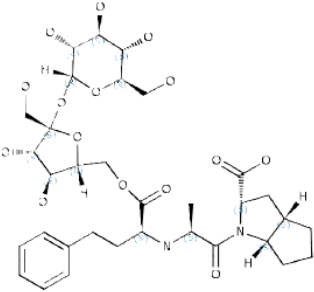
	Name:	Structure-2
	Cas No:	
	Derek Prediction:	INACTIVE: No misclassified or unclassified features
	Sarah Prediction:	NEGATIVE - 55%
	QSAR Prediction:	
	Similarity to API:	No Derek Alerts found
	Overall Carcinogenicity:	Unspecified
	Overall Ames:	Unspecified
	ICH M7 Class:	Class 5
	User Carcinogenicity:	Unspecified
	User Ames:	Unspecified
	CPDB Carcinogenicity:	Unspecified
	Lhasa Ames:	Unspecified
	Average Mol Mass:	712.74
Exact Mol Mass:	712.3055	
Log Kp:	-8.49	
Log P:	-2.01	
SMILES:	[H][C@]15CCC[C@]5([H])N([C@H](C1)C(O)=O)C([C@H](C)N[C@H](CCC=CC=CC=C2)C(OC[C@@]4([H])O[C@](CO)O[C@@]3([H])O[C@@H](CO)[C@@H](O)[C@H]3O)[C@@H](O)[C@H]4O)=O	
Comments:		

FIGURA 4.40. Avaliação de mutagenicidade – Proposta de estrutura 1.

Classification Card - Structure-3

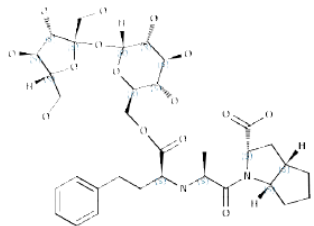
	Name:	Structure-3
	Cas No:	
	Derek Prediction:	INACTIVE: No misclassified or unclassified features
	Sarah Prediction:	NEGATIVE - 54%
	QSAR Prediction:	
	Similarity to API:	No Derek Alerts found
	Overall Carcinogenicity:	Unspecified
	Overall Ames:	Unspecified
	ICH M7 Class:	Class 5
	User Carcinogenicity:	Unspecified
	User Ames:	Unspecified
	CPDB Carcinogenicity:	Unspecified
	Lhasa Ames:	Unspecified
	Average Mol Mass:	712.74
	Exact Mol Mass:	712.3055
Log Kp:	-8.49	
Log P:	-2.01	
SMILES:	[H][C@]15CCC[C@]5([H])N([C@H](C1)C(O)=O)C([C@H](C)N[C@H](CCC2=CC=CC=C2)C(OC[C@H]4O[C@@]([H])(O)C[C@]3(CO)O[C@@]([H])(CO)[C@@H](O)[C@@H]3O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@@H]4O)=O	
Comments:		

FIGURA 4.41. Avaliação de mutagenicidade – Proposta de estrutura 2.

Classification Card - Structure-4

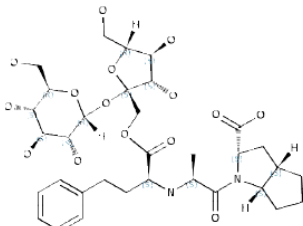
	Name:	Structure-4
	Cas No:	
	Derek Prediction:	INACTIVE: No misclassified or unclassified features
	Sarah Prediction:	NEGATIVE - 55%
	QSAR Prediction:	
	Similarity to API:	No Derek Alerts found
	Overall Carcinogenicity:	Unspecified
	Overall Ames:	Unspecified
	ICH M7 Class:	Class 5
	User Carcinogenicity:	Unspecified
	User Ames:	Unspecified
	CPDB Carcinogenicity:	Unspecified
	Lhasa Ames:	Unspecified
	Average Mol Mass:	712.74
	Exact Mol Mass:	712.3055
Log Kp:	-8.49	
Log P:	-2.01	
SMILES:	[H][C@]15CCC[C@]5([H])N([C@H](C1)C(O)=O)C([C@H](C)N[C@H](CCC2=CC=CC=C2)C(OC[C@]13O[C@@]([H])(CO)[C@@H](O)[C@@H]3O)O[C@@]4([H])O[C@@H](CO)[C@@H](O)[C@@H]4O)=O	
Comments:		

FIGURA 4.42. Avaliação de mutagenicidade – Proposta de estrutura 3.

Devido a isso, as impurezas podem ser definidas como classe 5, de acordo com a discussão do ICH M7 (Figura 4.43). Dessa forma, é possível utilizar os limites estabelecidos pela RDC n° 53/15 (0,5%, limite para impurezas conhecidas).

Class	Definition	Proposed action for control (details in Section 7 and 8)
1	Known mutagenic carcinogens	Control at or below compound-specific acceptable limit
2	Known mutagens with unknown carcinogenic potential (bacterial mutagenicity positive*, no rodent carcinogenicity data)	Control at or below acceptable limits (appropriate TTC)
3	Alerting structure, unrelated to the structure of the drug substance; no mutagenicity data	Control at or below acceptable limits (appropriate TTC) or conduct bacterial mutagenicity assay; If non-mutagenic = Class 5 If mutagenic = Class 2
4	Alerting structure, same alert in drug substance or compounds related to the drug substance (e.g., process intermediates) which have been tested and are non-mutagenic	Treat as non-mutagenic impurity
5	No structural alerts, or alerting structure with sufficient data to demonstrate lack of mutagenicity or carcinogenicity	Treat as non-mutagenic impurity

FIGURA 4.43. Definição das estratégias de controle baseadas na avaliação de mutagenicidade.

4.7. ESTRATÉGIAS DE CONTROLE E VALIDAÇÃO

Embora a identificação das substâncias tenha sido conclusiva e suficiente para o aumento da especificação (segundo a ótica da RDC nº 53/15), é necessário que figuras de mérito como exatidão, precisão, seletividade e linearidade (compreendendo o intervalo a partir do limite de quantificação) sejam avaliadas para confirmar que o método analítico é capaz de quantificá-las com segurança, em conformidade com a RDC nº 166/17.

Não existem padrões analíticos comercialmente disponíveis para as impurezas identificadas. Dessa forma, não é possível realizar a validação de parâmetros como exatidão e linearidade utilizando soluções padrão das substâncias. No entanto, uma vez que a adição do açúcar ocorre em uma região de baixa absorvidade no ultravioleta, os maiores contribuintes para a absorção nessa região permanecem intactos, como pode ser observado na Figura 4.44. O principal deles (anel benzênico) apresenta altíssima estabilidade química.

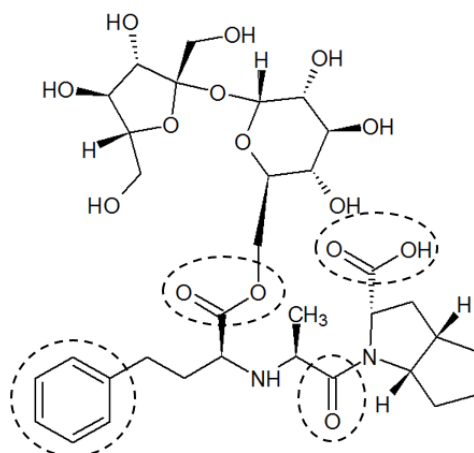


FIGURA 4.44. Contribuições principais para absorção UV.

Essa premissa é corroborada pela avaliação das Figuras 4.12, 4.13 e 4.14. De fato, não existem alterações nos grupos cromóforos das impurezas, uma vez que os espectros no ultravioleta são idênticos entre todas as substâncias.

5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, confirma-se a proposta de estrutura para as impurezas geradas sob condições de degradação térmica úmida. O fato de duas técnicas ortogonais levarem a um mesmo resultado valida o mecanismo teórico proposto e fornece subsídios para concluir que os produtos de degradação são de fato fruto da reação de transesterificação do ramipril com a sacarose (também conhecida como reação de acilação não específica). Dessa forma, pode-se concluir que:

- A caracterização das substâncias por LC-MS/MS e RMN confirmam inequivocamente que as impurezas geradas no estudo de estabilidade são fruto da reação do ramipril com o açúcar (sacarose) presente no *pellet*.

- Cada impureza é formada a partir de uma reação de transesterificação de um álcool primário da sacarose com o grupo éster do ramipril. Dessa forma, estruturas distintas são geradas.

- A caracterização das substâncias quanto ao potencial genotóxico indica que não existem riscos sanitários ao paciente. Dessa forma, suas especificações podem ser definidas com base na RDC nº 53/15 e elevadas de 0,2% para 0,5%.

- A avaliação teórica e experimental das propriedades químicas das impurezas identificadas permite afirmar que não existe alteração no grupo cromóforo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIAÇÃO DA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA DE PESQUISA (**INTERFARMA**). **Guia 2018**. Disponível em: www.interfarma.org.br/guia/guia-2018/dados_do_setor/. Acesso em: 26 de maio de 2018.
2. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (**ANVISA**). Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 23 de maio de 2018.
3. BRASIL. Resolução RDC nº 60, de 10 de outubro de 2014. Dispõe sobre os “**critérios para a concessão e renovação do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências**”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 26 de maio de 2018.
4. BRASIL. Resolução RE nº 01, de 29 de julho de 2005. Guia para a “**Realização de Estudos de Estabilidade**”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.
5. BRASIL. **Minuta de Guia de Estabilidade (Versão 2.0)**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 26 de maio de 2018.
6. BRASIL. Resolução RDC nº 53, de 4 de dezembro de 2015. 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**”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.
7. BRASIL. GOVERNO DO BRASIL. Disponível em: www.brasil.gov.br/editoria/saude/2017/09/doencas-cardiovasculares-sao-principal-cao-de-morte-no-mundo. Acesso em: 26 de maio de 2018.
8. U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (**FDA**). Disponível em: www.fda.gov. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.
9. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION (**ICH**). Disponível em: www.ich.org. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.
10. UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION (**USP**). Disponível em: www.usp.org. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.

11. BRITISH PHARMACOPOEIA (**BP**). Disponível em: www.pharmacopoeia.com. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.
12. EUROPEAN PHARMACOPOEIA (**EP**). Disponível em: www.edqm.eu. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.
13. BRASIL. Informe Técnico nº 01, de 15 de julho de 2008. Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº 01 de 29/07/2005, que trata do **Guia para realização dos estudos de estabilidade**. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.
14. BRASIL. Resolução 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**”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.
15. BRASIL. Consulta Pública nº 68, de 29 de agosto de 2014. Proposta de “**guia para obtenção do perfil de degradação, identificação e qualificação de produtos de degradação**”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 26 de maio de 2018.
16. BRASIL. Guia prático nº 4, versão 1, de 4 de dezembro de 2015. Guia para “**Obtenção do perfil de degradação, e identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos**”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.
17. BRASIL. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para “**Validação de métodos analíticos e bioanalíticos**”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.
18. NAPRIX: RAMIPRIL. Libbs Farmacêutica Ltda. Bula de remédio. Disponível em: www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico/. Acesso em: 26 de maio de 2018.
19. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION (ICH). **ICH Guidelines**. Disponível em: www.ich.org/products/guidelines.html. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.
20. BRASIL. LIBBS INDÚSTRIA FARMACÊUTICA Ltda. **Libbs – Indústria Farmacêutica**. Disponível em: www.libbs.com.br. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.
21. AULTON, M. E.; **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

22. YADAV, N.; VERMA, A. Pharmaceutical Pellets: A Versatile Carrier for Oral Controlled Delivery of Drugs. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, n.3, v. 50, p. 146-160, 2016.
23. GUPTA, A. M.; SHIVHARE, U. D.; SURUSE, P. B. Different Aspects of Pellets Formulation and their Evaluation. **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research**, n. 6, v. 4, p. 331-336, 2015.
24. SANTOS, H. M. M.; VEIGA, F. J. B.; PINA, M. E. T.; SOUSA, J. J. M. S. Obtenção de pellets por extrusão e esferonização farmacêutica. Parte I. Avaliação das variáveis tecnológicas e de formulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, n. 4, v. 40, p. 455-470, 2004.
25. SANTOS, H. M. M.; VEIGA, F. J. B.; PINA, M. E. T.; SOUSA, J. J. M. S. Obtenção de pellets por extrusão e esferonização farmacêutica. Parte II. Avaliação das características física de pellets. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, n. 3, v. 42, p. 309-318, 2006.
26. PEZZINI, B. R.; SILVA, M. A. S.; FERRAZ, H. G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, n. 4, v. 43, p. 491-502, 2007.
27. YADAV, V. Transdermal Drug Delivery System: Review. **International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research**, n. 2, v. 3, p. 376-382, 2012.
28. NAPRIX: NOSSOS PRODUTOS. Libbs Farmacêutica Ltda. Disponível em: www.libbs.com.br/nossos-produtos/?search_product=naprix. Acesso em: 26 de maio de 2018.
29. BAERTSCHI, S.W.; ALSANTE, K. M.; REED, R. A. **Pharmaceutical Stress Testing: Predicting Drug Degradation**. Reino Unido: Informa Healthcare, 2011.
30. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. **Introduction to Modern Liquid Chromatography**. Nova York: Academic Press, 1958.
31. CASS, Q. B.; CASSIANO, N. **Cromatografia Líquida: Novas tendências e aplicações**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
32. LANÇAS, F. M. **Cromatografia Líquida Moderna**. Campinas: Editora Átomo, 2009.
33. GODOY, R.; OLIVARES, M.; MENNICKENT, S.; GODOY, G.; DE DIEGO, M. Stress degradation studies of ramipril by a validated stability-indicating liquid chromatographic method. **Journal of the Chilean Chemical Society**, n. 4, v. 55, p. 450-453, 2010.

34. BELAL, F.; AL-ZAAGI, I. A.; GADKARIEM, E. A.; ABOUNASSIF, M. A. A stability-indicating LC method for the simultaneous determination of ramipril and hydrochlorothiazide in dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 335-342, 2001.
35. HANYSOVA, L.; VACLAVKOVA, M.; DOHNAL, J.; KLIMES, J. Stability of ramipril in the solvents of different pH. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 1179-1183, 2005.
36. CHEMICALIZE. Disponível em: www.chemicalize.com/#/calculation. Acesso em: 25 de maio de 2018.
37. UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION (**USP41-NF36**). USP Monographs: Ramipril. Disponível em: www.uspnf.com. Acesso em: 26 de maio de 2018.
38. BRITISH PHARMACOPOEIA (**BP**). Ramipril Capsules and Tablets Related Substances BP 2016. Disponível em: www.pharmacopoeia.com. Acesso em: 28 de janeiro de 2018.
39. BRASIL. Libbs Farmacêutica Ltda. **EDP 012_17: Estudo de Perfil de Degradação para os medicamentos Naprix D 5/12,5mg e 5/25mg**. Relatório interno. Versão 1 de 30 de novembro de 2017.
40. BRASIL. Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a “**validação de métodos analíticos e dá outras providências**”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: www.anvisa.gov.br. Acesso em: 28 de maio de 2018.