

Síntesis y caracterización de materiales de referencia certificados de impurezas de ingredientes farmacéuticos activos

Lucía Gandolfi Donadío^{1,2}, Laura Hermida¹, Judith Molinari¹, Cecilia Alberti¹, Matías Ciarlantini¹, Leandro Santos¹, Antonella Scravaglieri¹, Diego Fischer¹, Julieta Heba¹, Ana Bellomo¹, Luciano Paolo¹, Sergio Rillo¹, Mabel Puelles¹, Patricia Gatti¹, María J. Comin^{1,2*}

1) Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI)

2) Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

* Disertante en el V Congreso Internacional de Farmacia y Bioquímica Industrial EXPOFYBI 2019, Buenos Aires, 10-13 Septiembre 2019

Introducción

A partir de la promulgación de Ley N° 19.511/1972, el Instituto Nacional de Tecnología Industrial (INTI) fue designado Instituto Nacional de Metrología. En función de la reglamentación de esta ley, el INTI es responsable de producir, mantener y diseminar los patrones nacionales de medida, y diseminar trazabilidad metrológica en todo el territorio nacional. Esta diseminación se establece principalmente al Sistema Internacional de Unidades (SI). Además, tiene un rol en el aseguramiento de la calidad de las mediciones vinculadas con la producción industrial, la equidad en el comercio, y el cuidado del ambiente, la salud, los alimentos y la seguridad pública. La necesidad de mejorar las mediciones en la actualidad es una premisa fundamental del desarrollo industrial y por ende económico, de nuestro país.

Numerosas mediciones requieren de Materiales de Referencia Certificados (MRC) cuya función es establecer un valor de referencia para una propiedad contra la cual se compara el valor obtenido para la medición de interés. Según la norma ISO 17034:2016 "Requisitos generales para la competencia de los productores de materiales de referencia", un Material de Referencia (MR) se define como "un material o sustancia suficientemente homogéneo y estable con respecto a una o más de sus propiedades específicas, que se ha establecido como adecuado para el uso intencionado en un proceso de medición". Por lo tanto, los MRs pueden ser utilizados en la comprobación y validación de métodos de medición. Un Material de Referencia Certificado (MRC) es un MR caracterizado por un procedimiento metrológico validado para una o más de sus propiedades específicas, acompañado por un certificado que entrega el valor de la propiedad, su incertidumbre asociada y una declaración de la trazabilidad metrológica. Se pueden emplear principalmente en la calibración de instrumentos de medición y para estimar el sesgo de una medición. El uso apropiado de los MRs o MRCs se establece en función de los requisitos de trazabilidad e incertidumbre para una medición.

Combinando las capacidades existentes en INTI de investigación y desarrollo en síntesis química, caracterización de pequeñas moléculas y en la producción de MR para distintos sectores industriales, nos planteamos como objetivo el **Desarrollo de Materiales de Referencia Certificados de**

Sustancias Relacionadas (SR) de Ingredientes Farmacéuticos Activos (IFAs).

Las Sustancias Relacionadas son impurezas presentes en los IFAs, que pueden provenir de las materias primas dependiendo de su origen, generarse durante el proceso de síntesis del IFA, la elaboración y/o almacenamiento del producto. Su presencia y concentración deben controlarse en función de su toxicidad, según lo indicado en la Farmacopea Argentina y/o Farmacopeas internacionales. En general, estas sustancias son comercializadas por organizaciones internacionales, como por ejemplo la *United States Pharmacopeia* (USP) o la *European Pharmacopeia* (EP), y por lo tanto deben ser importadas. En algunos casos, aún no se dispone de sustancias relacionadas comerciales, ya sea por el dinamismo de los lanzamientos de nuevas moléculas, o bien por el descubrimiento de impurezas en IFAs no codificadas, como sucedió en 2018 con el descubrimiento de nitrosaminas en algunos antagonistas de los receptores de la angiotensina II, como valsartan, losartan, entre otros [1].

A partir de la firma de un convenio con ANMAT en 2015, el INTI elabora MRCs en el marco del Programa de Desarrollo de Sustancias de Referencia del INAME-ANMAT, en base a un listado consensuado de impurezas de IFAs, en relación a las necesidades de los laboratorios farmacéuticos.

Para comercializar un producto farmacéutico, los laboratorios deben presentar ante ANMAT un registro con el control de calidad del producto según farmacopea. Allí se describen los métodos de análisis a utilizar para cuantificar las impurezas codificadas, para los cuales debe contarse con MRs de estos compuestos. INAME tiene un portfolio limitado de Sustancias de Referencia (SR) disponibles, por lo tanto permite el uso de SR de proveedores extranjeros, como USP o EP, pero su importación es muy costosa, lo que justifica la necesidad de su producción local. En este sentido, en el año 2017 por ejemplo, se importaron MRs de SR por más de u\$s2.000.000, a un valor promedio de u\$s1.500 por unidad de venta, comúnmente 50 mg.

Las capacidades de Síntesis Química, Química Analítica y Metrología del INTI, permiten contribuir a aumentar la provisión nacional de MRs disponibles para la industria farmacéutica, con un ahorro potencial relacionado con la disminución de las importaciones. Por lo tanto, **el objetivo**

fundamental de este proyecto es mejorar la eficiencia en el control de calidad de los medicamentos, a través del desarrollo nacional de MRC siguiendo los lineamientos de las normas internacionales, a saber ISO 17034:2016 e ISO GUIDE 35:2017.

Metodología

En la Tabla 1 se muestran las etapas involucradas en la producción de MRCs de Sustancias Relacionadas de IFAs en INTI. Cada etapa incluye actividades, que van desde la selección de la sustancia a producir, hasta la confección del certificado, que es un requisito para los MRC.

Tabla 1: Etapas necesarias para la producción de un Material de Referencia Certificado de Sustancias Relacionadas de Ingredientes Farmacéuticos Activos.

Etapa	Actividades
Elección de la sustancia relacionada a desarrollar	Estudio de prefactibilidad técnico/económica: <ul style="list-style-type: none"> - Disponibilidad del MRC/MR en el mercado - Laboratorios potencialmente interesados - Antecedentes bibliográficos sobre la síntesis
Estudios preliminares	<ul style="list-style-type: none"> - Evaluación de antecedentes de síntesis y propiedades fisicoquímicas de la sustancia de interés seleccionada - Previsión de insumos y desarrollo de proveedores - Análisis de costos
Obtención del candidato a MRC por síntesis química	<ul style="list-style-type: none"> - Desarrollo del proceso de síntesis - Desarrollo de controles de proceso - Optimización - Escalado y obtención del lote
Caracterización del candidato a MRC	<ul style="list-style-type: none"> - Caracterización por técnicas espectroscópicas (RMN, IR, EM) - Otras caracterizaciones (DSC) - Impurezas orgánicas e inorgánicas. - Contenido de agua y solvente residuales. - Asignación de pureza por RMN cuantitativo (qRMN)
Fraccionamiento y acondicionamiento	<ul style="list-style-type: none"> - Selección de la masa por unidad de venta - Selección del envase y las condiciones de almacenamiento - Fraccionamiento
Homogeneidad	<ul style="list-style-type: none"> - Muestreo y verificación de homogeneidad de lote
Estabilidad	<ul style="list-style-type: none"> - Estudios de estabilidad en corto y largo plazo
Confección del certificado	<ul style="list-style-type: none"> - Evaluación e integración de resultados - Asignación de título - Declaración de la ruta de trazabilidad metrológica - Cálculo de incertidumbre

A partir de estudios de prefactibilidad técnico/económica (Tabla 1), se seleccionaron los siguientes candidatos a MRCs para producir en el mediano plazo:

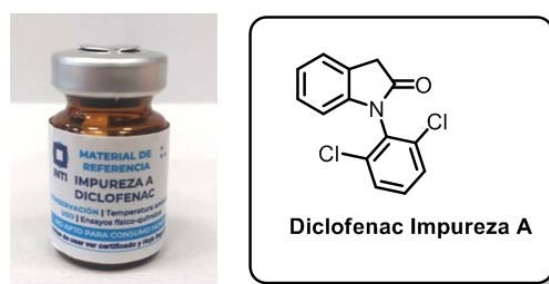
- Diclofenac Impureza A
- Ibuprofeno Impureza C
- Paracetamol Impureza J
- Carvedilol Imp D (la impureza C ya había sido producida

e incorporada al listado del INAME)

Resultados

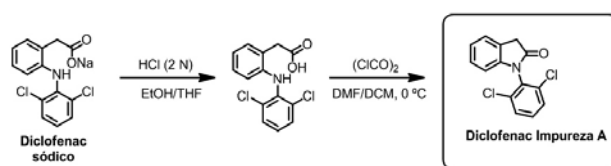
Uno de los primeros MRC seleccionados, que está disponible para la industria farmacéutica es el Diclofenac Impureza A (Ver Fig. 1). La principal causa de su elección es que el diclofenac es un IFA presente en más de 200 productos, que son comercializados en nuestro país por más de 50 laboratorios farmacéuticos. La EP ha discontinuado su producción, mientras que la USP lo comercializa a través de Merck a un precio de us\$ 2.383,70 por frasco de 25 mg.

Fig. 1: Unidad del MRC de Diclofenac Impureza A (100 mg) producida por el INTI (izquierda); estructura química de la Sustancia Relacionada correspondiente (derecha)



En cuanto a su factibilidad técnica, la síntesis de la Impureza A del Diclofenac es un proceso simple de dos pasos de reacción, que además parte de una materia prima económica y accesible (diclofenac sódico). El primer paso consiste en la obtención del diclofenac ácido por tratamiento con ácido clorhídrico en THF/etanol (Fig. 2). Por escalado secuencial de este proceso (5[®]10[®]100g) se obtuvo un producto sólido con un rendimiento cercano al 100%.

Fig. 2: Esquema de síntesis de la Impureza A del Diclofenac. Se muestran los dos pasos de síntesis seleccionados y los principales reactivos involucrados.



Para el segundo paso de síntesis, la formación de la lactama, se siguió el procedimiento descrito por Wang et al. [3], incorporando algunas modificaciones para lograr un proceso escalable, que permitió obtener un lote de 80 g de Diclofenac Imp. A con un rendimiento de 80% y alta pureza.

Una vez obtenido el candidato a MRC se realizaron las siguientes mediciones para su caracterización, utilizándose un enfoque directo por qRMN:

- Espectrofotometría Infrarroja
- RMN ¹H, ¹³C, ¹H-¹H, ¹H-¹³C
- Espectrometría de Masas
- Título por RMN cuantitativo (qRMN)
- Impurezas Relacionadas

- Residuo por Ignición
- Contenido de Agua (Karl Fisher)
- Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

La Figura 3 muestra ejemplos de las caracterizaciones realizadas para verificar la estructura química del candidato a MRC y verificar su pureza. Los espectros de masa y termogramas obtenidos por DSC, se corresponden con los esperados para la estructura química de la Impureza A del Diclofenac y la ausencia de posibles impurezas provenientes de la síntesis.

Para asignar el título al candidato a MRC se empleó un método primario de medición: RMN cuantitativo (qRMN). Se prepararon soluciones de la muestra y un estándar interno de ácido benzoico NIST (*National Institute of Standards and Technology*) trazable al 3,5-BTMFBA, (NIMJ Lot 4601a 99.96±0.06%) del Instituto Metrológico Nacional de Japón (NIMJ). Los espectros RMN se obtienen bajo parámetros específicos, medidos y optimizados para cada molécula. Un requisito para poder emplear qRMN es que tanto la muestra como el estándar deben presentar al menos una señal cada una, que esté libre de superposiciones e interferencias, por esto se incluyen experimentos RMN 2D para verificar la ausencia de señales provenientes de otras sustancias en las regiones de interés del espectro (ver Fig.4). Se realizaron los cálculos correspondientes para obtener el título del MR y la incertidumbre asociada, a partir de cuatro mediciones independientes, por triplicado.

La Pureza determinada para la Impureza A de Diclofenac desarrollada en INTI fue de 100 ± 1 (fracción máscica %). El valor certificado posee trazabilidad al Sistema Internacional de Unidades (SI) a través de procedimientos primarios de medición (qRMN). La incertidumbre expandida fue calculada multiplicando la incertidumbre estándar por un factor de cobertura k=2 que provee un nivel de confianza de aproximadamente 95%, bajo una distribución normal. Con estos resultados se emitió el certificado correspondiente y se obtuvo el MRC INTI -MRC010 - IAD

001 (CAS: 15362-40-0; IUPAC *1-(2,6-Dichlorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-one, N-(2,6-Dichlorophenyl)-2-indolinone*).

Como se mencionó anteriormente, otra de las sustancias relacionadas seleccionadas para la producción del MRC respectivo fue la **Impureza C del Ibuprofeno** (4-isobutylacetofenona; CAS 38861-78-8). Existen más de 150 productos en el mercado nacional que contienen ibuprofeno y sus combinaciones con otros IFAs, que son comercializadas por alrededor de 40 laboratorios. El estándar USP está disponible en ampollas de 0,2 ml y actualmente es importado por Merck a un precio de u\$s1.682 x 3 ampollas.

La Impureza C puede en teoría obtenerse a partir de ibuprofeno, que es una materia prima accesible y económica. Se tomó como referencia el esquema de síntesis propuesto por Mete et al. para la obtención de aldehídos y cetonas a partir de ácidos arilacéticos en medio acuoso [4]. En el trabajo se describen las condiciones para la ruptura oxidativa del ácido (en este caso ibuprofeno) por acción de un oxidante como el persulfato de potasio (K₂S₂O₈) en medio acuoso a reflujo, para obtener la cetona correspondiente. Cabe aclarar que se trata de una reacción en fase heterogénea, ya que el ibuprofeno no es soluble en fase acuosa. Los autores reportaron un rendimiento del 89% hasta una escala de gramos. Sin embargo, no se logró reproducir estos resultados; por el contrario, se obtuvieron numerosos productos de oxidación y gran parte del ibuprofeno quedó sin reaccionar, alcanzando un rendimiento inferior al 15%. Por lo tanto, se procedió a estudiar diferentes condiciones para optimizar el rendimiento. Se varió la concentración del oxidante, el tiempo y temperatura de reacción y se emplearon distintos solventes (mezclas de agua y acetonitrilo), sin lograr mejoras sustanciales en los resultados.

Se decidió cambiar la estrategia, ensayando una reacción en medio homogéneo. Se ensayaron distintas condiciones variando la relación ibuprofeno-oxidante, tiempo y temperatura, y pH. La Figura 5 muestra el esquema básico para la síntesis de la Impureza C a partir de Ibuprofeno.

Fig. 3: Ensayos de caracterización realizados al candidato a MR del Diclofenac Impureza A. Espectro de masa obtenido en un espectrómetro Waters-Quattro Premier XE, en modo de ionización Electrospray positivo (ESI+) (izquierda); termogramas obtenidos por DSC en un equipo MettlerStar SW 8.10, realizando ciclos de calentamiento-enfriamiento-calentamiento (derecha).

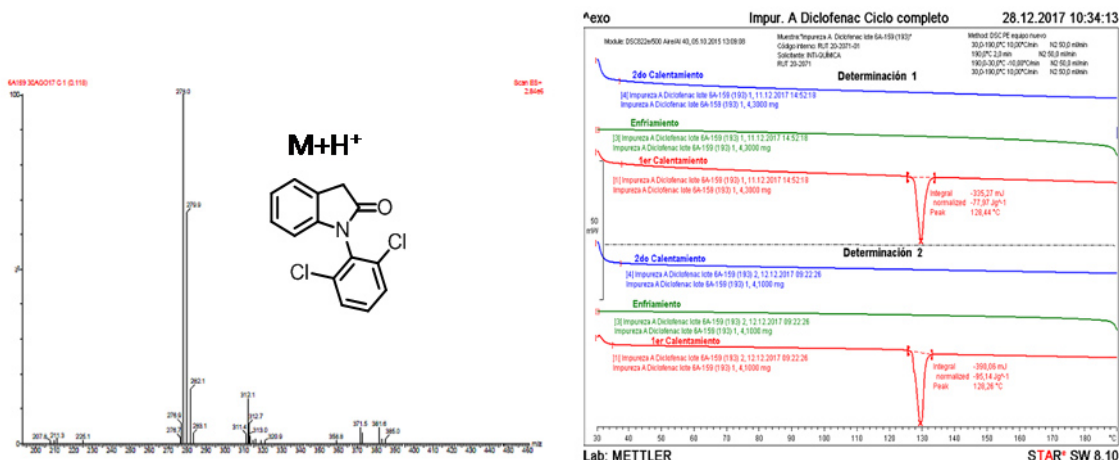


Fig. 4: Determinación de pureza del candidato a MR Diclofenac Impureza A por RMN cuantitativo (qRMN) en un equipo BRUKER DPX400MHz. Comparación con el Estándar Interno (EI) de ácido benzoico del NIST trazable al SI a través del MRC 3,5 BTfBA NIMJ 4601a (izquierda); espectro 2D de correlación 1H-1H para verificar la ausencia de interferencias en las regiones de interés del espectro (derecha).

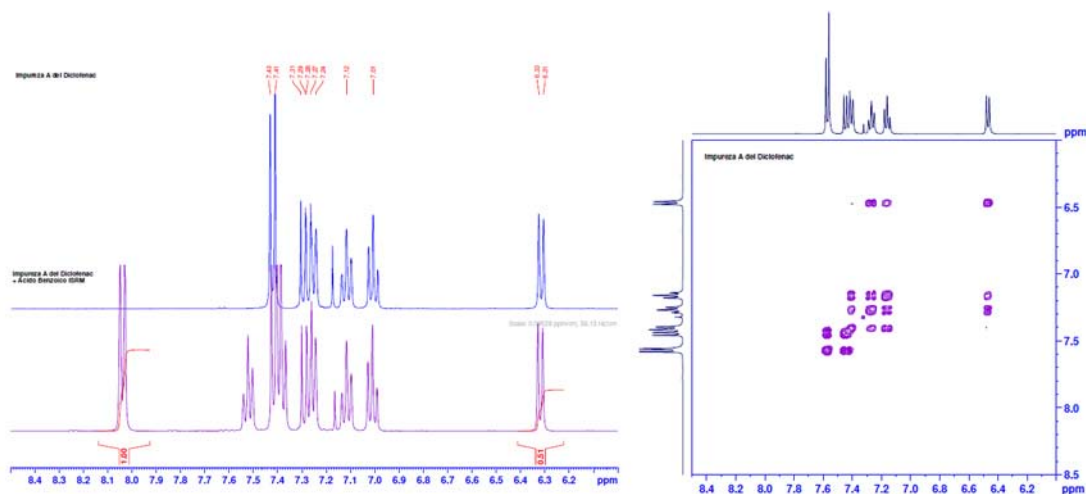
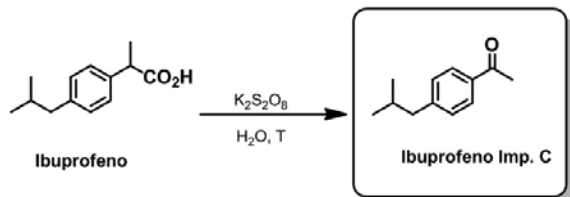


Fig. 5: Esquema de síntesis de la Impureza C del Ibuprofeno seleccionado para la obtención del MRC.



Las mejores condiciones halladas resultaron en un rendimiento del 40% para una escala de hasta 10g. Este producto fue purificado por columna y se obtuvo un candidato a material de referencia de alta pureza, según lo observado por RMN. Si bien el rendimiento de la reacción es relativamente bajo, se logró una mejora del *work up*, del control de proceso (ahora en fase homogénea) y un proceso escalable de una única etapa de reacción y a partir de un material de partida económico. Los próximos pasos serán el escalado y la caracterización del lote para obtener el MRC de la Impureza C del Ibuprofeno.

También comenzó a ensayarse la síntesis de dos impurezas de interés: **Paracetamol Impureza J** (CAS 539-03-7) y **Carvedilol Impureza D** (CAS 51997-51-4). Hasta el momento se obtuvieron resultados promisorios hasta una escala de 20g, con rendimientos de 77 y 82% respectivamente.

Por otro lado, en el INTI desarrollamos procesos de síntesis para obtener impurezas a pedido, empleando las herramientas ya descritas para el desarrollo de MRC. Estos materiales son provistos de un título por qRMN para declarar su pureza. Algunos ejemplos de los IFAs para los cuales se sintetizaron impurezas son: Fingolimod, Sildenafil, Dronedrona, Ivabradina, Mitoxantrona, Topiramato, Gabapentina y Valsartan.

Conclusiones:

La producción y distribución de Materiales de Referencia Certificados, empleados en diversas mediciones, son fundamentales para fortalecer los controles de calidad de muchos sectores industriales y promover su desarrollo. En particular, la accesibilidad de los laboratorios farmacéuticos a MRC de Sustancias Relacionadas contribuye a la competitividad de las empresas, ya que podrían disponer de estos materiales a costos razonables, evitando la importación. En algunos casos incluso, pueden desarrollarse procesos para obtener impurezas no disponibles en el mercado, necesarias para el control de materia prima y producto terminado según el origen de la materia prima.

El INTI a partir de sus capacidades y experiencia en Síntesis Química, Química Analítica y Metrología, colabora en forma permanente con ANMAT y con las empresas del sector farmacéutico y farmoquímico, en el desarrollo nacional de Materiales de Referencia Certificados de impurezas de IFAs, para mejorar la eficiencia del control de calidad de los medicamentos. ■

Referencias

- [1] <https://www.fundacionfemeba.org.ar/blog/farmacologia-7/post/actualizacion-sobre-las-impurezas-de-nitrosaminas-47429>
- [2] Chung, M., Dos Santos, J., Oliveira, E., Blau, L., Menegon, R., Gonçalves Peccinini, R. Synthesis, ex Vivo and in Vitro Hydrolysis Study of an Indoline Derivative Designed as an Anti-Inflammatory with Reduced Gastric Ulceration Properties. *Molecules*14(9): 3187-3197, Agosto 2009.
- [3] Wang, F., Finin, J., Tait, C., Quirk, S., Chekhtman, I., Donohue, A. Ng, S., D'Souza, A., Tait, R., Prankerd, R. The Hydrolysis of Diclofenac Esters: Synthetic Prodrug Building Blocks for Biodegradable Drug-Polymer Conjugates. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 105(2): 773-785, Febrero 2016.
- [4] Mete, T., Khopade, T., Bhat, R. Oxidative decarboxylation of arylacetic acids in water: One-pot transition-metal-free synthesis of aldehydes and ketones. *Tetrahedron Letters* 58(29):2822-2825 Julio 2017.