



# Identificação e Avaliação Toxicológica de Impurezas e Produtos de Degradação em Matéria-Prima e Medicamentos

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

---

PROF. RODRIGO MOREIRA DA SILVA  
([RODEIRA@USP.BR](mailto:RODEIRA@USP.BR))

NPPNS - NÚCLEO DE PESQUISAS EM  
PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS

# Impurezas

---

- ❑ A obtenção de um IFA pode consistir em muitas etapas sintéticas;
- ❑ Impurezas podem ser formadas em qualquer etapa e se tornam mais evidentes após o escalonamento do lote;
- ❑ Impurezas devem ser controladas devido ao seu potencial de toxicidade;
- ❑ **ICH** → para uma dose máxima maior ou igual a 2 g por dia, qualquer impureza detectada a 0,1% deve ser identificada.

# ANVISA

## Impurezas e produtos de degradação

	Dose máxima diária	Limites
Limites de Notificação	$\leq 1$ g	0,1%
	$> 1$ g	0,05%
Limites de Identificação	$< 1$ mg	1,0% ou 5 $\mu$ g ATD
	1 mg - 10 mg	0,5% ou 20 $\mu$ g ATD
	$> 10$ mg - 2 mg	0,2% ou 2 mg ATD
	$> 2$ mg	0,1%
Limites de Qualificação	$< 10$ mg	1,0% ou 50 $\mu$ g ATD
	10 - 100 mg	0,5% ou 200 $\mu$ g ATD
	$> 100$ mg - 2 g	0,2% ou 3 mg ATD

### Exemplo:

Ingestão diária 2,5 mg

Limite de Notificação 0,1%

Limite de Identificação 0,5%

Limite de Qualificação 1,0%

(ATD = Administração Total Diária)

Limites: porcentagem de PD em relação ao IFA ou ATD de um PD.

# Identificação de impurezas / PD

---

## Pharmaceutical Impurity Identification: A Case Study Using a Multidisciplinary Approach

KAREN M. ALSANTE,<sup>1</sup> PETER BOUTROS,<sup>1</sup> MICHEL A. COUTURIER,<sup>2</sup> ROBERT C. FRIEDMANN,<sup>2</sup> JEFFREY W. HARWOOD,<sup>1</sup>  
GEORGE J. HORAN,<sup>1</sup> ANDREW J. JENSEN,<sup>1</sup> QICAI LIU,<sup>1</sup> LINDA L. LOHR,<sup>1</sup> RONALD MORRIS,<sup>1</sup> JEFFREY W. RAGGON,<sup>2</sup>  
GEORGE L. REID,<sup>1</sup> DINOS P. SANTAFIANOS,<sup>1</sup> THOMAS R. SHARP,<sup>1</sup> JOHN L. TUCKER,<sup>2</sup> GLENN E. WILCOX<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Analytical Research & Development Department, Pharmaceutical Sciences, Pfizer Global Research & Development, Pfizer Inc., Groton, Connecticut 06340

<sup>2</sup>Chemical Research & Development Department, Pharmaceutical Sciences, Pfizer Global Research & Development, Pfizer Inc., Groton, Connecticut 06340

<sup>3</sup>Bioprocess Research & Development Department, Pharmaceutical Sciences, Pfizer Global Research & Development, Pfizer Inc., Groton, Connecticut 06340

*Received 6 February 2004; revised 25 March 2004; accepted 31 March 2004*

*Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/jps.20120*

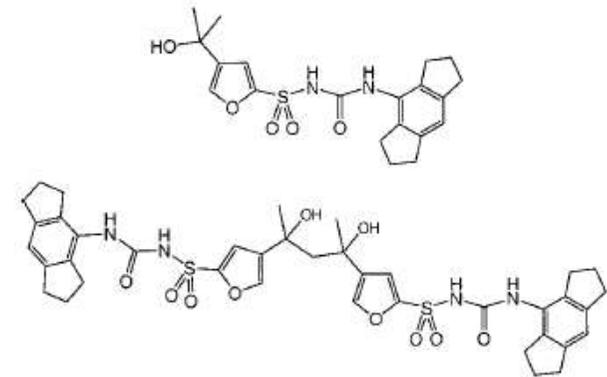
# Impureza B

---

IFA → candidato a fármaco 1-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-3-[4-(1-hydroxy-1-methyl-ethyl)-furan-2-sulphonylurea;

16 - 17 impurezas geradas no processo;

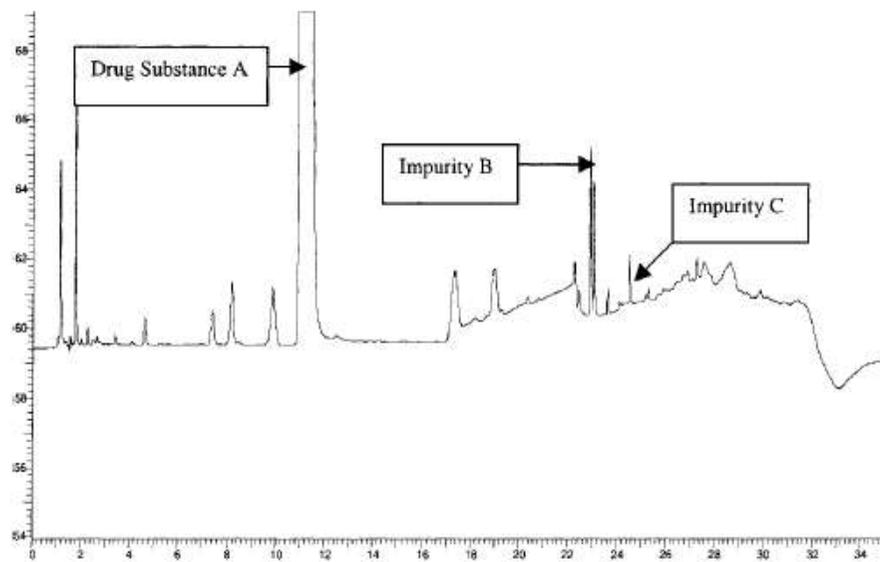
Preparo para testes clínicos → **impureza B** a 0,15%;



**Figure 1.** Structure of drug substance A (top,  $C_{20}H_{24}N_2O_5S$ , r.m.m. 404) and impurity C (bottom,  $C_{39}H_{44}N_4O_{10}S_2$ , r.m.m. 792).

# Cromatograma (CLAE)

---



**Figure 3.** A typical chromatographic impurity profile of drug substance. For chromatographic conditions, see Experimental section.

A maioria das impurezas são conhecidas ou controladas;

ICH / ANVISA podem ser identificadas pelo tempo de retenção ou propriedades espectrais;

A impureza B (aproximadamente 23 min.) precisa ser identificada.

# Estratégias

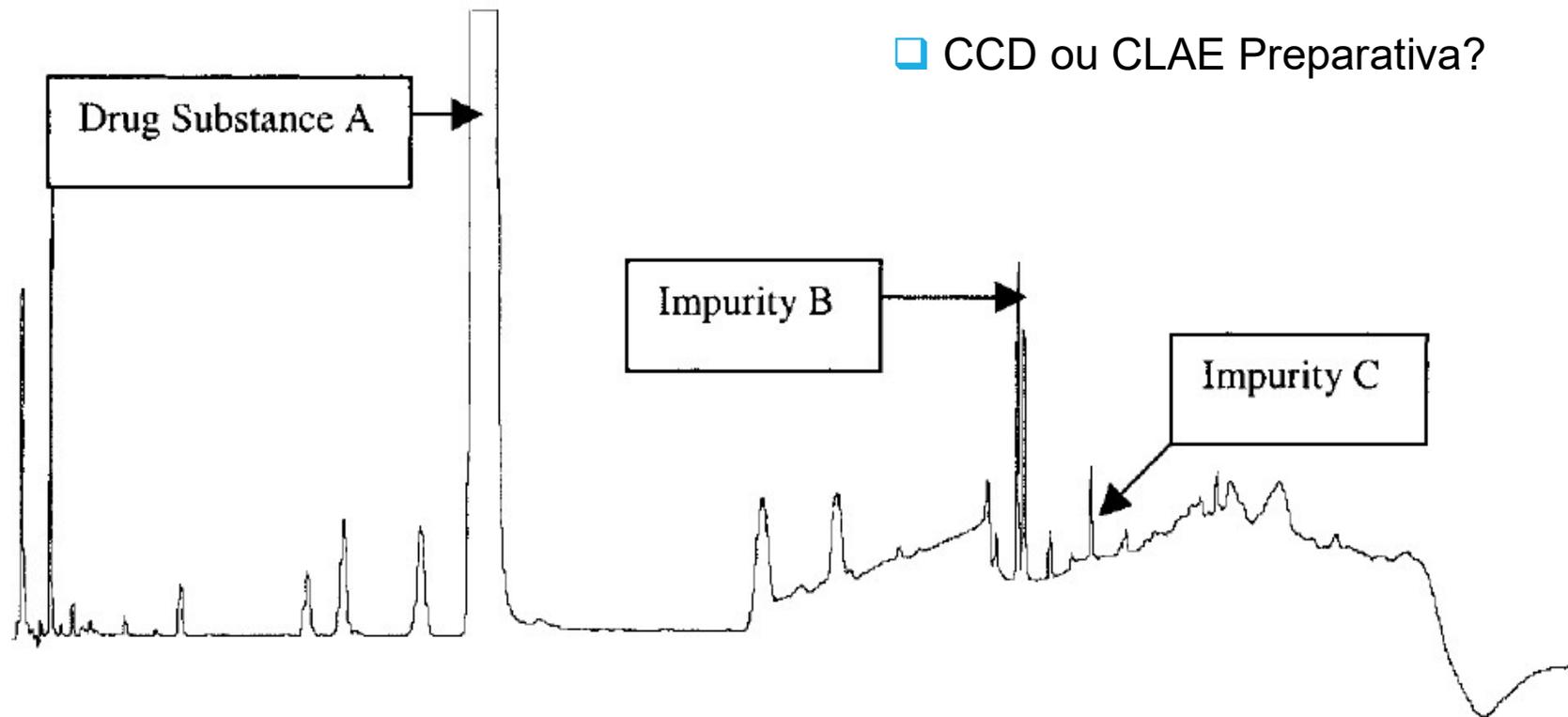
---

- LC-MS → possibilita conhecer a massa do composto de interesse (impureza B → 775 Da);
- LC-MS/MS → possibilita indicar se a impureza tem similaridades estruturais com o ativo e/ou outras impurezas conhecidas (impureza B:  $[M+H]^+$  776 → 603 e 706 → 577);
- RMN → possibilita complementar os estudos de elucidação estrutural.
- LC-RMN → sem necessidade de isolamento do analito a ser elucidado / requer alta concentração

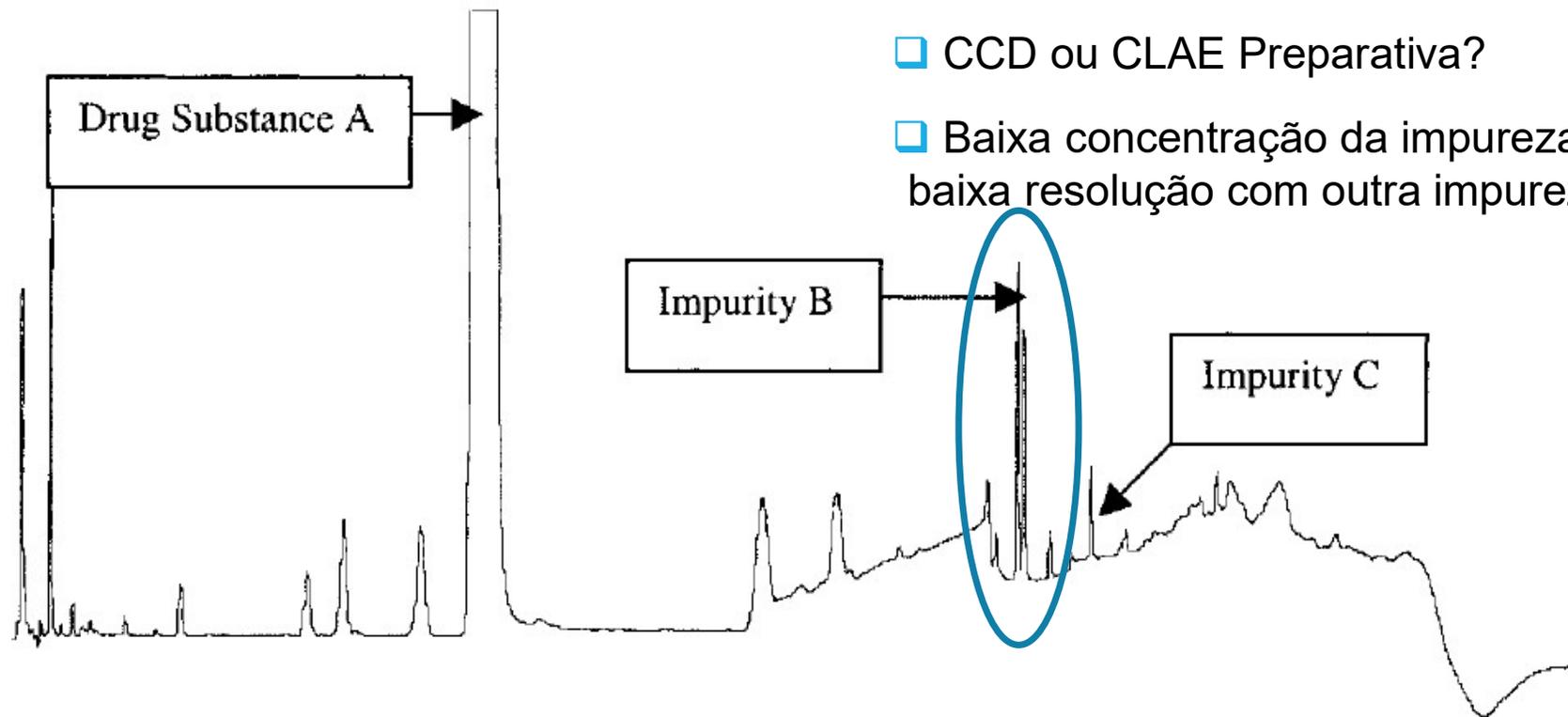
Impureza B → ISOLAMENTO

# Estratégia

---



# Estratégia



CCD ou CLAE Preparativa?

Baixa concentração da impureza B e baixa resolução com outra impureza

# CLAE Analítica x Preparativa



## HPLC Analítico

**Objetivo da separação:**  
tantos picos quanto possíveis, separados da linha de base

**Volume de amostra:**  
tão pequeno quanto possível (1 a 20  $\mu$ l por injeção)

**Diâmetro interno da coluna:** 1 a 4 mm

**Tamanho de partícula:**  
Vazão: 1,0 ml/min

**Deteção:** tão sensível quanto possível

**Formato de pico:** gaussiano para poder ser analisado

**Coleta de frações:** não

**Custo de solvente:** baixo

**Recuperação de solvente:** não

**Gradiente:** otimiza a separação e aumenta a velocidade

## HPLC Preparativo

**Objetivo da separação:**  
interessados somente no pico da substância-alvo

**Volume de amostra:**  
tanto quanto possível sem sobreposição de pico > 20  $\mu$ l

**Diâmetro interno da coluna:** > 4 mm

**Tamanho de partícula:** > 5  $\mu$ m  
Vazão: 5 a 5000 ml/min

**Deteção:** monitoramento, saturação pode ser problemática

**Formato de pico:** não importa, desde que o pico do produto esteja limpo

**Coleta de frações:** sim (automatizada)

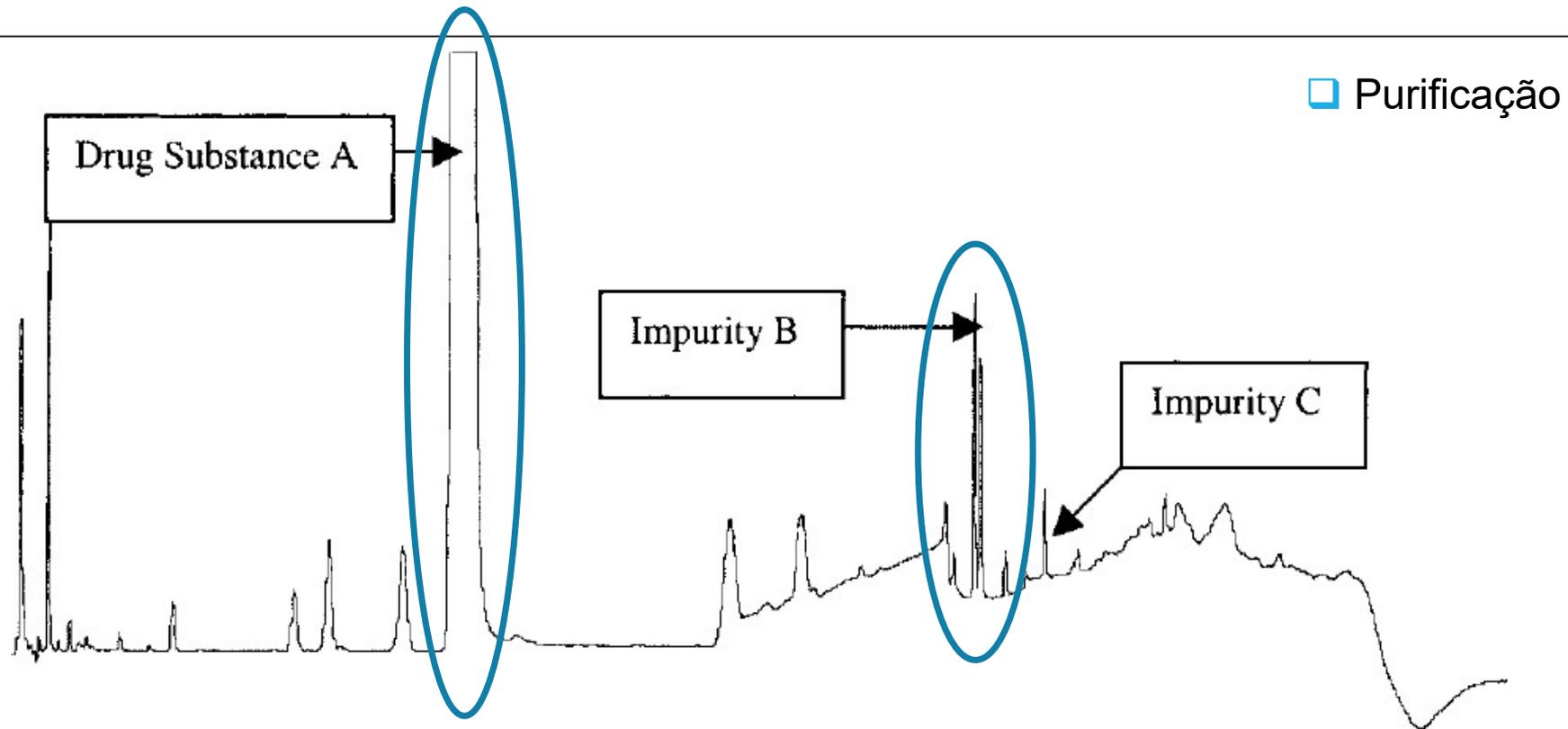
**Custo de solvente:** alto

**Recuperação de solvente:** desejável, reciclagem

**Gradiente:** interfere com a reciclagem do solvente



# Estratégia



# Gradiente de eluição

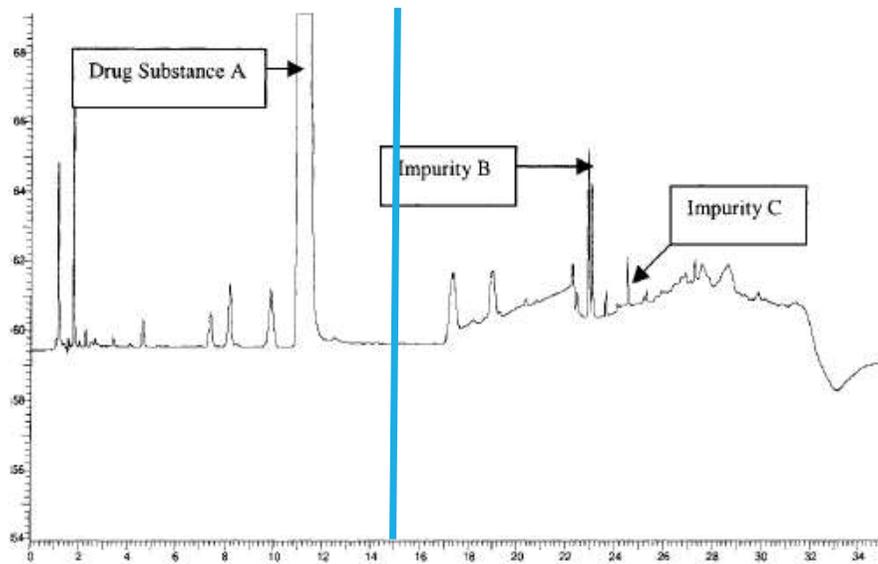


Figure 3. A typical chromatographic impurity profile of drug substance. For chromatographic conditions, see Experimental section.

Tempo (min)	Solvente A KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM (pH 5,2) (%)	Solvente B Acetonitrila 80% (%)
1	93	7
15	93	7
25	50	50
35	50	50

CLAE analítica de fase reversa;

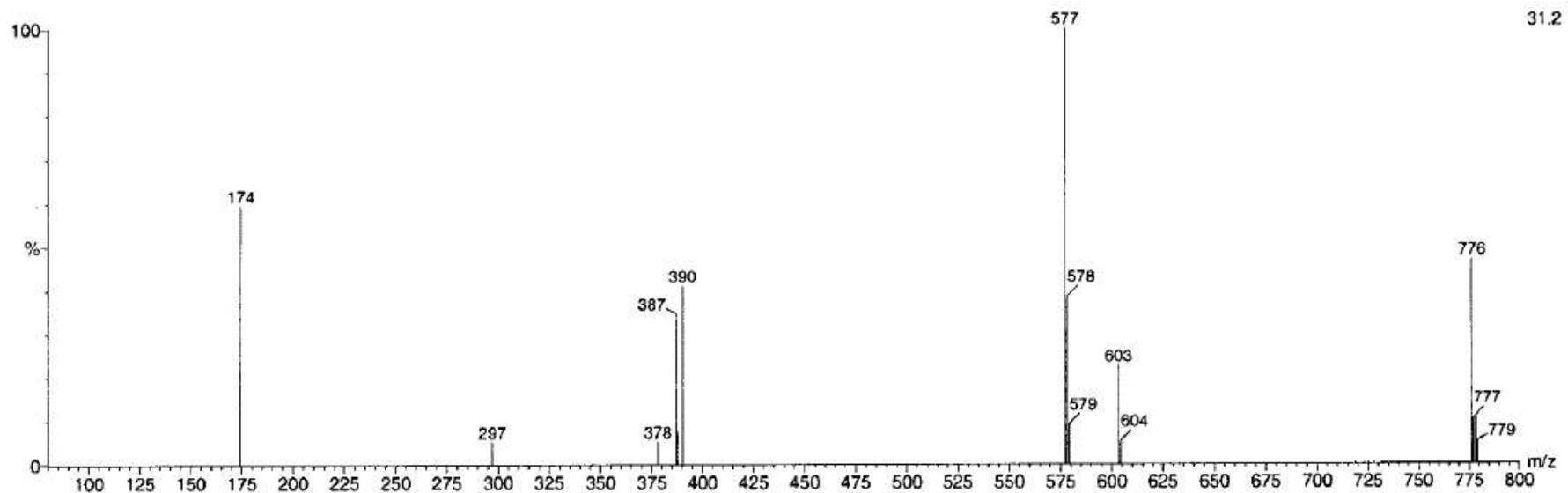
O fármaco A elui muito antes da impureza B;

→ SPE de fase reversa

# LC-MS/MS

---

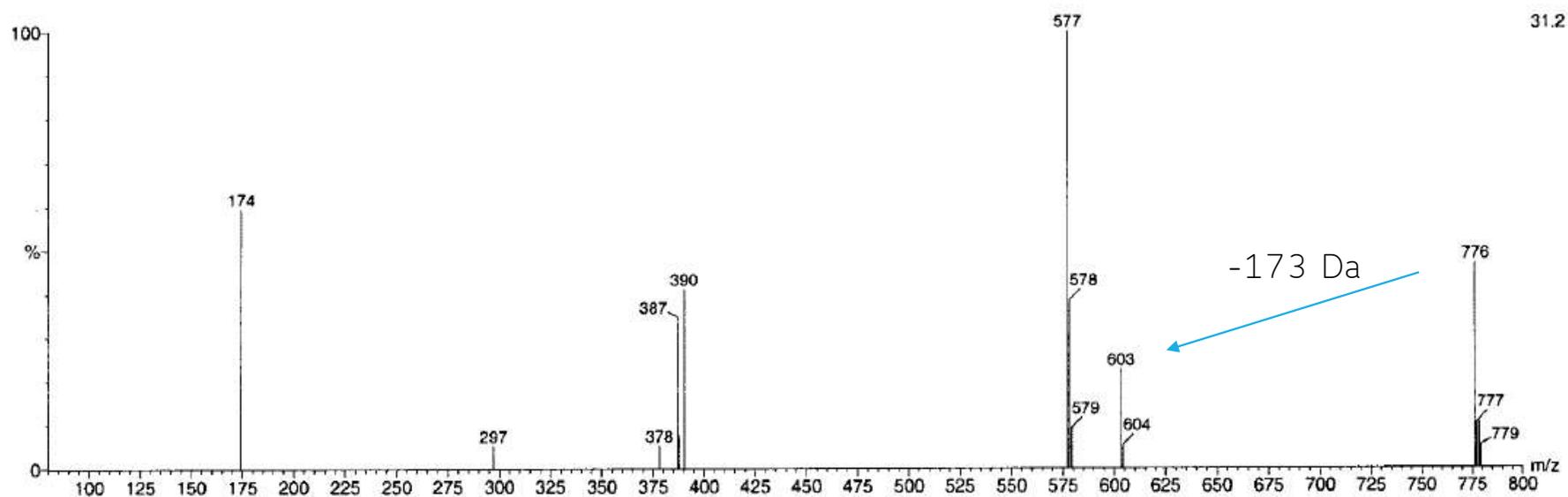
- Foram feitas análises em ambos, produto *in bulk* (lote produzido) e material isolado e foram obtidos os mesmos espectros de massas.



**Figure 5.** MS-MS product ion spectrum of the assigned  $m/z$  776  $[M+H]^+$  ion of impurity B.

# LC-MS/MS

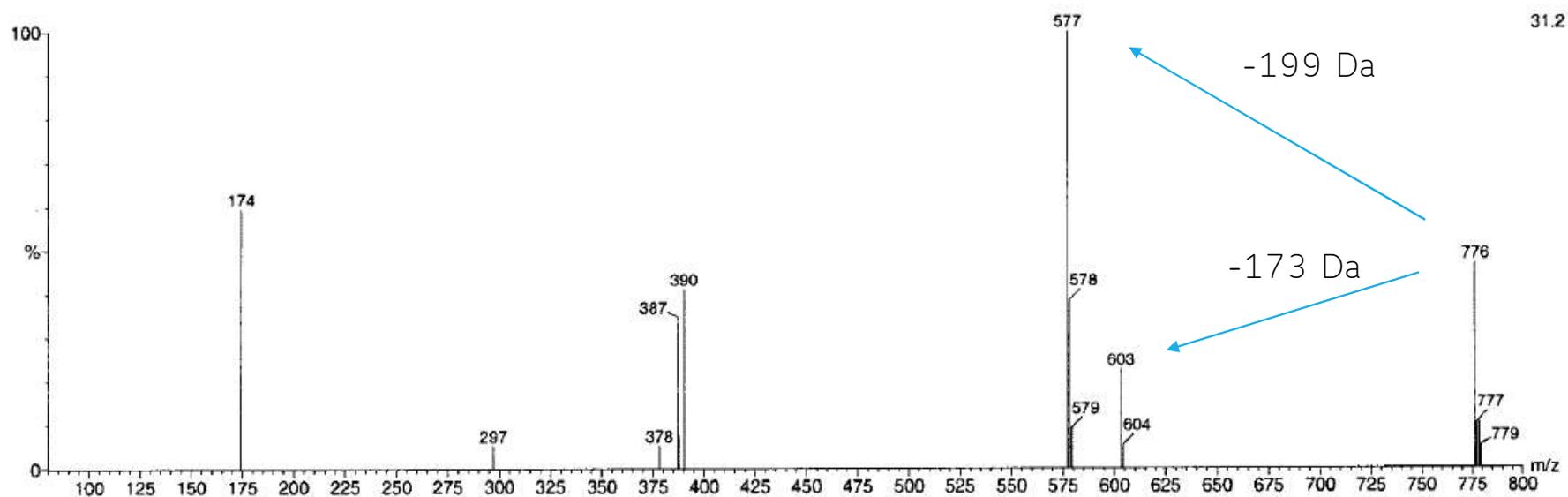
- Foram feitas análises em ambos, produto *in bulk* (lote produzido) e material isolado e foram obtidos os mesmos espectros de massas.



**Figure 5.** MS-MS product ion spectrum of the assigned  $m/z$  776  $[M+H]^+$  ion of impurity B.

# LC-MS/MS

- Foram feitas análises em ambos, produto *in bulk* (lote produzido) e material isolado e foram obtidos os mesmos espectros de massas.

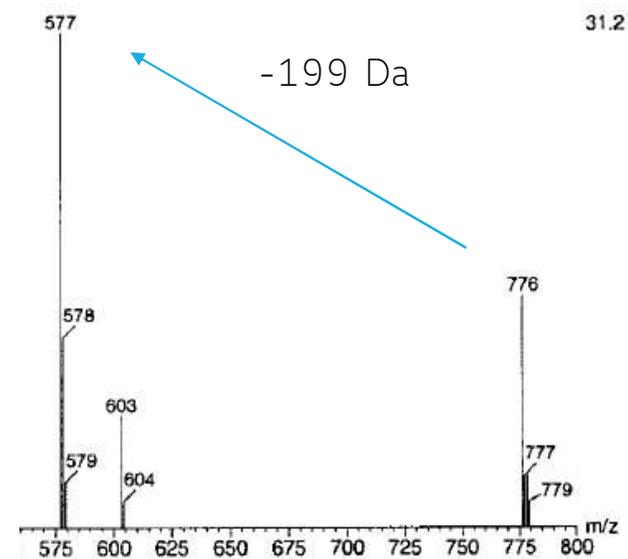
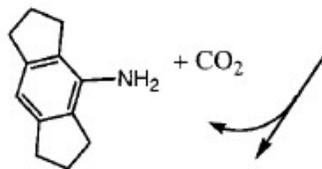
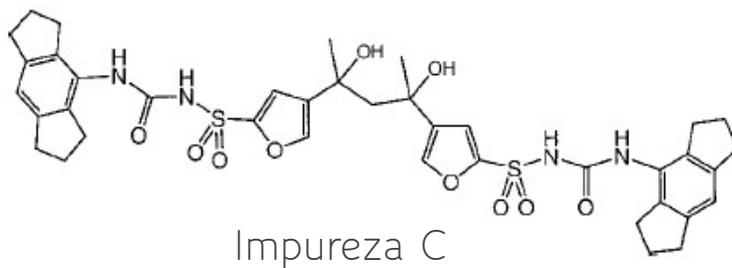


**Figure 5.** MS-MS product ion spectrum of the assigned  $m/z$  776  $[M+H]^+$  ion of impurity B.

# LC-MS/MS

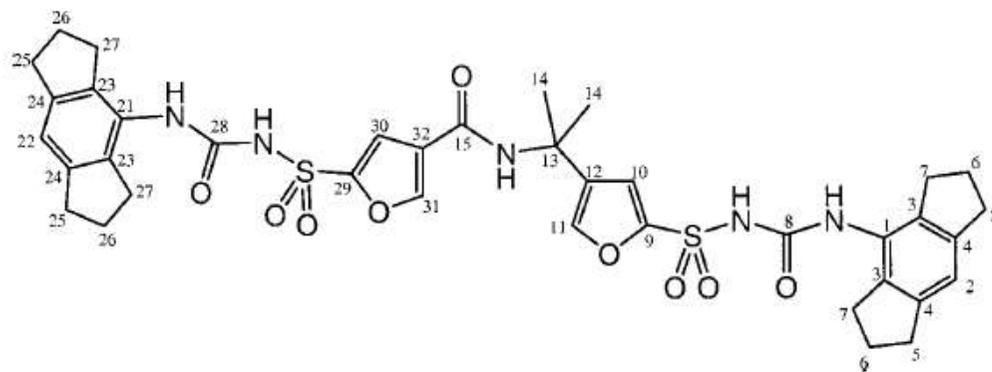
- Foram feitas análises em ambos, produto *in bulk* (lote produzido) e material isolado e foram obtidos os mesmos espectros de massas.

[M+H]<sup>+</sup> m/z 793

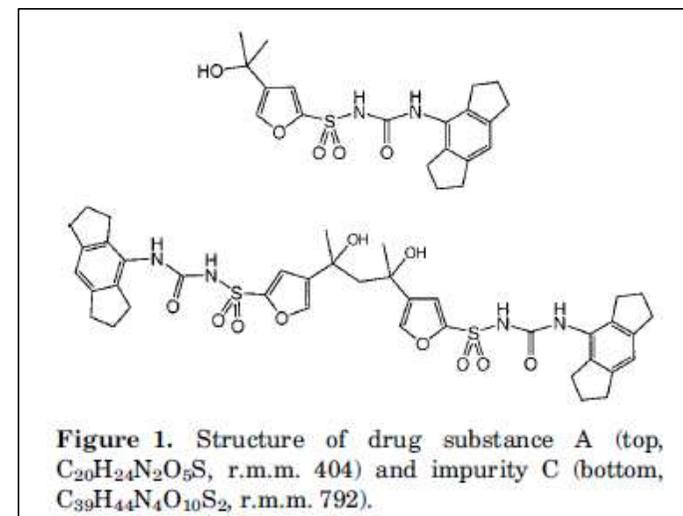


# LC-MS/MS + RMN

---



**Figure 6.** Structure of impurity B ( $C_{38}H_{41}N_5O_9S$ , r.m.m. 775, atom numberings refer to NMR assignments).



**Figure 1.** Structure of drug substance A (top,  $C_{20}H_{24}N_2O_5S$ , r.m.m. 404) and impurity C (bottom,  $C_{39}H_{44}N_4O_{10}S_2$ , r.m.m. 792).

# Referências

---

- Alsante, K.M. et al. Pharmaceutical Impurity Identification: A Case Study Using a Multidisciplinary Approach. *J. Pharm Sci*, 2004, 93, 2296-2309.
- Melo, S.R.O.; Mello, M.H.; Silveira, D. Advice on Degradation Products in Pharmaceuticals: A Toxicological Evaluation. *PDA J Pharm Sci and Tech*, 2014, 68, 221-238.
- Baertschi S.W. *et al* "Pharmaceutical Stress Testing: predicting drug degradation" 2<sup>nd</sup> Ed., Informa Healthcare, 2011.
- European Medicine Agency. GHMP Guideline on the Limits of Genotoxic Impurities, 2006.
- ANVISA. Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia. Guia para condução de estudos não clínicos de segurança necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Ministério da Saúde: Brasil, 2010.