



Remoção de impurezas genotóxicas

As impurezas genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas, mesmo quando presentes em pequenas quantidades, podem constituir um aspecto crítico no desenvolvimento de fármacos

Cristina Balerini

A maioria dos fármacos disponíveis no mercado é obtida por meio da utilização, como reagentes ou catalisadores, de moléculas reativas que podem ser genotóxicas ou mesmo carcinogênicas e que podem permanecer no insumo farmacêutico ativo (IFA) ou no fármaco final como impurezas. Vários compostos de diferentes famílias químicas já foram catalogados como genotóxicos, pois têm a capacidade de interagir com o DNA, impedindo sua replicação.

As impurezas genotóxicas, mutagênicas e carcinogênicas, mesmo quando presentes em pequenas quantidades, podem constituir um aspecto crítico no desenvolvimento de fármacos. A avaliação de um nível seguro de exposição a estas impurezas e o estabelecimento dos limites correspondentes são os principais desafios e preocupações dos fabricantes de produtos farmacêuticos.

Os IFAs inevitavelmente contêm impurezas. "O importante é definir o

perfil aceitável para o uso pretendido sem comprometer a segurança e a eficácia terapêutica do princípio ativo. Algumas dessas impurezas podem causar alterações no material genético (DNA) e induzir a mutações genéticas ou a rearranjos cromossômicos. No entanto isso não constitui necessariamente uma prova de periculosidade em relação à saúde, mas indica potencial mutagênico ou carcinogênico, contribuindo para o desenvolvimento de tumores, por exemplo",

explica Alessandra Lifschitz Viçosa, tecnóloga em Saúde Pública Sênior do Laboratório de Farmacotécnica Experimental da vice-diretoria de Ensino, Pesquisa e Inovação do Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanquinhos/Fiocruz).

O perfil de segurança de impurezas e produtos de degradação em IFAs e medicamentos é uma preocupação não muito recente da comunidade científica, da indústria e dos órgãos reguladores. A formação de impurezas mutagênicas e/ou impurezas potencialmente mutagênicas é um dos pontos a serem considerados na avaliação da degradação dos IFAs, demandando estratégias de gestão do risco que envolvem o mapeamento destas impurezas após estudos teóricos, estudos de estresse e de estabilidade.

"Durante um processo de síntese de insumos farmacêuticos ativos (IFAs), impurezas ditas como compostos relacionados podem ser provenientes do excesso molar dos materiais de partida, subprodutos, intermediários de síntese, solventes e catalisadores. Já os produtos de degradação geram impurezas oriundas da degradação química de qualquer componente do medicamento durante sua fabricação ou armazenamento. "Qualquer um destes compostos, se confirmados como tóxicos, podem apresentar potencial genotoxicidade."

No último caso, acrescenta Danielle Palma de Oliveira, professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP/USP) e presidente da Sociedade Brasileira de Toxicologia, as impurezas podem surgir em decorrência dos efeitos da luz,

da umidade e da temperatura durante transporte ou armazenamento

Como identificar os compostos genotóxicos

Segundo Alessandra, os compostos genotóxicos apresentam estruturas diversas e pertencem a famílias químicas diferentes. Do ponto de vista químico, não têm propriedades físico-químicas ou elementos estruturais comuns que permitam uma identificação rápida e fácil. "Existem algumas moléculas cujo efeito genotóxico é conhecido, enquanto outras são perigosas devido à presença de grupos reativos que podem levar à genotoxicidade; estes grupos estão catalogados como alertas estruturais", explica. Estima-se que cerca de 20% a 25% de todos os intermediários utilizados na síntese farmacêutica padrão contêm alertas estruturais.

O conhecimento científico sobre as estruturas de alerta de toxicidade eventualmente presentes nas substâncias químicas e os efeitos tóxicos a que estas estão associadas, bem como a incorporação desta informação em programas informáticos (tecnologias in silico), estudados e validados para prever a genotoxicidade, a mutagenicidade e a carcinogenicidade, são uma ferramenta útil à medida em que permitem realizar menos ensaios toxicológicos em animais, economizar tempo e diminuir custos.

Segundo Alessandra, é possível utilizar sistemas in silico, como o DEREK (Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge), para determinar alertas estruturais para atividade genotóxica. "Muitas vezes os alertas estruturais sobrestimam o potencial mutagênico, uma vez que

NEUBERGER
Sinônimo de Qualidade

90
Anos
**QUALIDADE
INCOMPARÁVEL**

KIKUSUI

REPRESENTANTE
EXCLUSIVO
NO BRASIL

**FERRAMENTAS E EQUIPAMENTOS
COM QUALIDADE INCOMPARÁVEL**

Tel. +55 11 2965-5927 2965-0187

www.neuberger.com.br



Alessandra Lifschitz Viçosa

não levam em consideração fatores como o peso molecular, a hidrofiliabilidade, a reatividade, o impedimento estereoquímico ou a simetria molecular. As impurezas genotóxicas estão presentes na reação química devido à sua introdução na mesma, como solventes, reagentes ou catalisadores, ou devido à sua formação como produtos secundários. Exemplos de algumas classes de compostos genotóxicos: haletos de alquila e ésteres, sulfatos de alquila, epóxidos, hidrazinas, N-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO), aminas aromáticas, sulfonatos e os seus precursores e solventes orgânicos."

Para certas classes de medicamentos, devido à natureza química, via de administração ou efeito terapêutico, podem ser necessárias abordagens específicas para análise do perfil de degradação, para avaliação do potencial genotóxico das impurezas e para a caracterização de limites aceitáveis. Por exemplo, no caso de produtos semissintéticos ou obtidos

por fermentação, para os quais certos limites podem não ser praticáveis; medicamentos de uso tópico, para os quais se deve considerar diferenças de biodisponibilidade; ou ainda, medicamentos antineoplásicos, cujo ativo pode ser considerado mutagênico e carcinogênico; entre outros.

Para qualificar as impurezas genotóxicas, resalta Alessandra, são necessários métodos analíticos muito sensíveis e seletivos para separar os baixos níveis de impurezas. "A quantificação é a parte mais complicada. Somente a utilização de detectores específicos, tais como massa-massa com cromatografia líquida de alta eficiência, para melhorar a seletividade do método. Procedimentos analíticos devem ser desenvolvidos para as impurezas que inesperadamente produzam efeitos tóxicos e farmacológicos em níveis menores que o limite de identificação, podendo os limites de qualificação serem alterados quando se comprova a segurança ou toxicidade."

“A formação de impurezas genotóxicas é um dos pontos a serem considerados na avaliação da degradação de IFAs, demandando estratégias de gestão do risco que envolvem o mapeamento destas impurezas após estudos teóricos, estudos de estresse e de estabilidade”

Processos de purificação

Segundo Alessandra, a remoção usual de impurezas genotóxicas consiste na utilização de processos como recristalização, destilação fracionada, resinas de troca iônica e várias técnicas de cromatografia. Embora estes processos de purificação originem produtos puros, o seu custo costuma ser elevado devido às perdas de IFAs. "Com relação aos processos envolvendo o uso de resinas ou cromatografia, geralmente o IFA purificado é originalmente obtido altamente diluído e deve ser concentrado. Além disso, parte do IFA fica retida na resina ou na coluna. Já na utilização da destilação fracionada, o IFA pode se decompor devido às altas temperaturas utilizadas e a destilação requer muita energia. Durante repetidas recristalizações uma elevada quantidade de IFA se perde dissolvida nas águas-mães

e normalmente é necessário resfriamento, o que novamente aumenta o consumo de energia.”

Sendo assim, os processos usuais de purificação de IFAs têm impacto significativo no custo total do IFA final. Durante a última década foram desenvolvidas outras técnicas, como polímeros de impressão molecular (MIPs) e nanofiltração com solventes orgânicos. Os MIPs são preparados através da incorporação da molécula-alvo em uma matriz polimérica. “O alvo é removido deixando um local de reconhecimento molecular na matriz de modo que a estrutura final do polímero mostre uma afinidade aumentada para a remoção de moléculas usadas como molde. Os MIPs apre-

sentam algumas vantagens como a síntese simples e elevada estabilidade em condições físicas e químicas adversas, apresentando estabilidade em solventes orgânicos. No entanto estão associados a alguns problemas como fuga do molde, incompatibilidade com meio aquoso, baixa capacidade de afinidade com o polímero e transferência de massa lenta”, diz Alessandra.

Já a nanofiltração é um processo de separação por membranas que se rege pelos princípios de exclusão molecular. O solvente passa através de uma membrana semipermeável por meio da aplicação de pressão. As principais vantagens associadas ao processo, diz a especialista, são o custo vantajoso, dado que uma gran-

de quantidade de IFA bruto pode ser purificada por uma membrana disponível no mercado e relativamente barata; o processo ocorre sob pressão e o IFA purificado não se dilui, não sendo necessária concentração e nem lavagem da coluna ou da resina, o que torna o processo vantajoso em termos de tempo.

“Dado que a maioria dos IFAs é apenas solúvel em solventes orgânicos, a compatibilidade com eles é uma das mais importantes vantagens do processo. De forma diferente à purificação usual de IFAs - por exemplo, agentes de formação de sais para recristalização - não são necessários produtos químicos adicionais. O aumento de escala dos processos de

Apresentando o Smart Manufacturing Kit

Agora é fácil (e acessível) operar
uma Fábrica Inteligente



Baseado no TraksYS, o Smart Manufacturing Kit é uma solução “out-of-the-box” construída pela HSI, empresa brasileira integradora de Sistemas com mais de 15 anos de experiência na implantação de soluções para suporte à Melhoria Contínua e Lean. O Smart Manufacturing Kit fornece:

- Coleta de Dados flexível
- Gestão de KPIs, Perdas, Velocidade, Takt e mais
- Andons / Gestão à vista
- Notificações para smartphones
- Opção para publicação e análise de dados na “nuvem”

O Smart Manufacturing Kit é fácil de implementar. Com as ferramentas de configuração “web based” integradas, em apenas algumas horas já está instalado e pronto para uso. E, o melhor de tudo, sem grande investimento inicial. O Smart Manufacturing Kit pode ser alugado em parcelas trimestrais de acordo com o número de Unidades de Processo de sua planta. Quer saber mais? Entre em contato conosco hoje mesmo.



+55 11 4468-6868

contato@hsi@hsinet.com.br

www.hsinet.com.br

“Para certas classes de medicamentos, devido à natureza química, via de administração ou efeito terapêutico, podem ser necessárias abordagens específicas para análise do perfil de degradação, para avaliação do potencial genotóxico das impurezas e para a caracterização de limites aceitáveis”

aves - não são necessárias temperaturas elevadas ou pressões extremas - contribuem também para a economia de energia do processo. Quando se utiliza a nanofiltração com solventes orgânicos em cascata é possível a recuperação de praticamente todo o produto.”

Aspectos regulatórios

No Brasil, o conjunto de novas exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) em vigor, a RDC 53/2015, que orienta sobre a condução de estudos de degradação forçada, tem o objetivo de identificar o perfil de degradação de medicamentos e fundamentar o desenvolvimento de métodos indicativos de estabilidade para que seja possível caracterizar adequadamente produtos de degradação potenciais e reais, e neste último caso, avaliar a segurança segundo os critérios e limites estabelecidos.

A formação de impurezas genotóxicas é um dos pontos a serem considerados na avaliação da degradação de IFAs, demandando estratégias de gestão do risco que envolvem o mapeamento destas impurezas após estudos teóricos, estudos de estresse e de estabilidade. “Devido ao fato de as diretrizes ICH Q3A(R2), ICH Q3B(R2) (análogas à RDC 53/2015 no Brasil) e ICH Q3C(R3) não contemplarem a avaliação de impurezas genotóxicas, em 2014 foi publicada a diretriz M7—*Assessment and Control of DNA reactive (mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to limit Potential Carcinogenic Risk* pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH), que define critérios para o estabelecimento de níveis de impurezas genotóxicas ou produtos de degradação que resultem em um risco aceitável. Considerando que impurezas genotóxicas são um grupo especial e podem oferecer riscos

membranas é direto, dependendo principalmente da área da superfície da membrana. A nanofiltração com solventes orgânicos permite a fácil implementação do processo no modelo atual de produção de IFA, uma vez que não é necessário nenhum equipamento específico ou reator. A substituição de um método usual de purificação de IFA por nanofiltração com solventes orgânicos conduz à simplificação do processo. As condições su-



“Para qualificar as impurezas genotóxicas, ressalta Alessandra, são necessários métodos analíticos muito sensíveis e seletivos para separar os baixos níveis de impurezas”

à saúde mesmo abaixo dos limites de qualificação preconizados pelas normas anteriores, a nova diretriz estabelece critérios para avaliação e definição de limites aceitáveis”, explica Alessandra.

Segundo a diretriz ICH M7, a avaliação de segurança envolve uma análise das impurezas para classificação através da busca de dados na literatura e bases de dados em relação à carcinogenicidade e à mutagenicidade. Se não há dados disponíveis, a diretriz M7 orienta para a realização de uma avaliação *in silico*, envolvendo estudos de relação estrutura-atividade (QSAR) para classificação da impureza.

Alessandra diz ainda que outro importante documento regulatório relacionado aos testes de genotoxicidade para produtos farmacêuticos é a ICH S2 (R1) intitulada *Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use*. “A diretriz está dividida em cinco partes: a parte I especifica o âmbito da diretriz e inclui a definição e princípios gerais de testes de genotoxicidade. A parte II

descreve um conjunto de testes para as substâncias ativas e inclui testes para mutações gênicas em bactérias *in vivo* e *in vitro*. As partes III a V contêm recomendações específicas para testes *in vitro*, testes *in vivo* e para a avaliação dos resultados obtidos.”


Ensaio de genotoxicidade

“Atualmente vários ensaios são preconizados por agências regulatórias para avaliar a toxicidade genética dos insumos, como o Teste de Ames, que avalia mutações gênicas; o ensaio de micronúcleo e o teste cometa, que avaliam danos cromossômicos, além de vários outros que permitem avaliar o potencial mutagênico, genotóxico e carcinogênico de compostos químicos”, explica Danielle.

Estes testes são ensaios de curta duração, acessíveis do ponto de vista econômico e constituem uma forma eficaz de determinar se o novo composto tem capacidade para interagir ou afetar a capacidade de regeneração do DNA, causar mutações ou provocar danos aos cromossomos, conferindo assim todos os indicadores de carcinogenicidade.

“Os testes de genotoxicidade podem ser realizados de duas maneiras. Uma delas integra os seguintes testes: teste de mutação genética em bactérias; teste citogenético para avaliação de dano cromossômico (teste de aberração cromossômica ou teste de micronúcleo *in vitro*) ou um teste *in vitro* de mutação genética em células de linfoma de ratinho; e teste *in vivo* para genotoxicidade, usualmente um teste de dano cromossômico em células hematopoiéticas de roedores, onde se detectam micronúcleos ou aberrações cromossômicas. A segun-

da opção inclui teste de mutação genética em bactérias e um teste para avaliação de genotoxicidade *in vivo* em dois tecidos, geralmente um teste de micronúcleo em células hematopoiéticas de rato e um segundo ensaio *in vivo*. Um ensaio de mutação genética é geralmente considerado suficiente para dar suporte a todos os estudos clínicos de administração única.

“Com os avanços no tema da segurança de impurezas é cada vez mais evidente a importância da integração entre as áreas analítica, regulatória e toxicológica, o que hoje ainda não é rotina nos ambientes industriais farmacêuticos. São necessários aprofundamentos nos estudos para avaliação de segurança de impurezas e justificativas de limites; conhecimentos sobre toxicologia e aspectos regulatórios para profissionais da área de desenvolvimento analítico, controle de qualidade e outros; e até mesmo um investimento para a implementação de laboratórios internos de execução de modelagens *in silico* e classificação de mutagenicidade conforme os critérios do ICH M7. O impacto da exposição a impurezas genotóxicas pode ter correlação com o risco de câncer e outros efeitos, e por se tratar de um efeito latente e silencioso, pode ser considerado uma questão com implicações éticas e de saúde pública, já que estas diretrizes reguladoras visam assegurar tanto a segurança de pacientes em testes clínicos como produtos em fase de comercialização”, finaliza Alessandra. 

Cristina Balerini – Editora da
Contract Pharma Brasil