

## AVALIAÇÃO DO USO DE METABISSULFITO DE SÓDIO COMO MITIGADOR DA FORMAÇÃO DE NITROSAMINAS EM MEDICAMENTOS

Marisa J. S. Chaves<sup>1,2</sup>; Vanessa S. Paiva<sup>2</sup>; Paulo C. Souza<sup>1,2</sup>; Pedro A. Amaral<sup>2</sup>; Rodolfo Fini<sup>2</sup>; Vanderson S. Bispo<sup>2</sup>; Carla B. G. Bottoli<sup>1</sup>

1 - Universidade Estadual de Campinas, Institute of Chemistry, Campinas, São Paulo, Brazil, 13083-862.

2 - Laboratório Cristália, Analytical Development Department, Itapira, São Paulo, Brazil, 13970-000

**Palavras-Chave:** Impurezas mutagênicas, Formulações farmacêuticas, Avaliação de risco.

### Introdução

A indústria farmacêutica vem enfrentando desafios constantes desde que foi relatado a presença de nitrosaminas em medicamentos da classe das sartanas em 2018. Estas impurezas orgânicas são caracterizadas pela presença de um grupo amina ligado a um grupo nitroso, classificadas pela Organização Mundial da Saúde (WHO) como prováveis agentes cancerígenos em humanos (TEASDALE, 2017). Dados de estudos em animais de 228 nitrosaminas revelam que 82% são considerados carcinógenos in vivo (THRESHER et al., 2019). Na indústria farmacêutica, as nitrosaminas são formadas em processos de fabricação que empregam aminas secundárias ou terciárias e agentes nitrosantes (nitratos e nitritos) em uma ampla faixa de pH, por meio de mecanismos diversos (CHANG et al., 2020).

Em 2018, N-nitrosodimethylamine (NDMA) e N-nitrosodiethylamine (NDEA) foram detectadas em medicamentos do grupo sartanas. Posteriormente, descobriu-se que essas impurezas são formadas durante a síntese do anel tetrazólico, em que se utiliza nitrito de sódio (agente nitrosante) e dimetilformamida (DMF), solvente que pode conter traços de aminas (LÓPEZ-RODRÍGUEZ et al., 2020). Além das sartanas, medicamentos como ranitidina, pioglitazone, nizatidina, rifampicina, rifapentina, vareneclina, quinapril, propranolol e amitriptilina também tiveram lotes retirados do mercado devido a presença de nitrosaminas (WAGNER et al., 2021).

As nitrosaminas podem ser formadas a partir de diversos caminhos reacionais, mas no contexto da produção de medicamentos, a principal via é a nitrosação de aminas secundárias e terciárias por agente nitrosante, principalmente o nitrito, o qual é uma impureza comum em excipientes (PONTING et al., 2022; MOSER et al., 2023). Para que ocorra a reação de nitrosação é necessário a presença de um agente nitrosante e de uma amina. Essa reação tende a ser favorecida em meios de pH próximos ao pKa do ácido nitroso (pH = 3,15) (ASHWORTH et al., 2020). Quando se trata da indústria farmacêutica, mais de 40% dos insumos farmacêuticos ativos (IFA) possuem pelo menos um grupo amina secundário ou terciário, os quais são utilizados em diversas formulações farmacêuticas em altas concentrações (mg/mL ou mg/g) (SCHLINGEMANN et al., 2023). Por outro lado, o agente nitrosante mais comum em medicamentos é o nitrito. Esta é uma impureza conhecida presente em excipientes, água, IFA, entre outros, e é considerada o reagente limitante da reação de nitrosação em produtos farmacêuticos.

Assim, uma vez que insumos farmacêuticos ativos e excipientes podem contribuir para a formação de nitrosaminas, os medicamentos podem estar sujeitos a contaminações, sendo necessário identificar, monitorar e controlar estes compostos (ASHWORTH et al., 2023). Estratégias para controlar e mitigar o risco das nitrosaminas são rotineiramente necessárias [14]. A remoção de nitrito é vista como uma das estratégias de mitigação mais promissoras. Compostos antioxidantes como ácido ascórbico (vitamina C), ascorbato de sódio, maltol, galato de propila, ácido para-aminobenzóico (PABA) e L-cisteína, tem sido utilizados com eficiência na eliminação de nitrito de formulações líquidas e sólidas (PONTING et al., 2023; BAYNE et al., 2023; NANDA et al., 2021).

O metabissulfito de sódio é um agente redutor inorgânico aplicado a alguns produtos farmacêuticos, principalmente para melhorar a estabilidade daqueles sensíveis à oxidação. O metabissulfito de sódio pode reagir diretamente ao oxigênio, radicais livres e outros oxidantes, prevenindo a oxidação do IFA. Este excipiente em proporções estequiométricas pode reduzir o nitrito a algumas espécies não oxidantes. Portanto, o objetivo deste estudo é avaliar o potencial do uso de metabissulfito na mitigação de nitrosaminas em medicamentos líquidos e apresentar um modelo matemático útil para aplicações na mitigação de nitrosaminas em solução.

### **Material e Métodos**

Com o objetivo de avaliar o potencial uso do metabissulfito de sódio na mitigação de formação de nitrosaminas, foi realizado um planejamento experimental de face centrada, no qual foram avaliadas as variáveis independentes pH (3,0, 4,5 e 6,0), pKa das aminas (metilanilina pKa 4,68, morfolina pKa 8,015 e dibutilamina pKa 11,35) e concentração de metabissulfito (0, 0,5 e 1,0 mg/mL). A concentração de amina e nitrito foi mantida em 0,05 mol/L e 10 µg/mL, respectivamente, em todos os testes.

Durante a execução do DoE, foram realizados experimentos sem a presença de metabissulfito, os quais foram utilizados para verificar a cinética de nitrosação da metilanilina, morfolina e dibutilamina. Com esses dados, é possível discutir a influência do pKa das aminas e do pH do meio na cinética de nitrosação. Para avaliar os resultados obtidos pelo DoE, foi utilizado o software StatEase 360. Um modelo matemático que relaciona pH, pKa de aminas e concentração de metabissulfito foi obtido.

Para determinar o erro do modelo matemático, foram realizadas cinco repetições do ponto central. Após a realização das reações, foram realizadas análises por HPLC-MS/MS após 90min, 1, 2, 3 e 6 dias para verificar a estabilidade da reação e monitorar a formação de nitrosaminas à temperatura ambiente (25°C). Os resultados foram reportados em mmol/mL. A eficiência de mitigação de nitrosaminas foi calculado pela relação entre a concentração de nitrosamina formada em cada experimento contendo metabissulfito e seu correspondente sem metabissulfito.

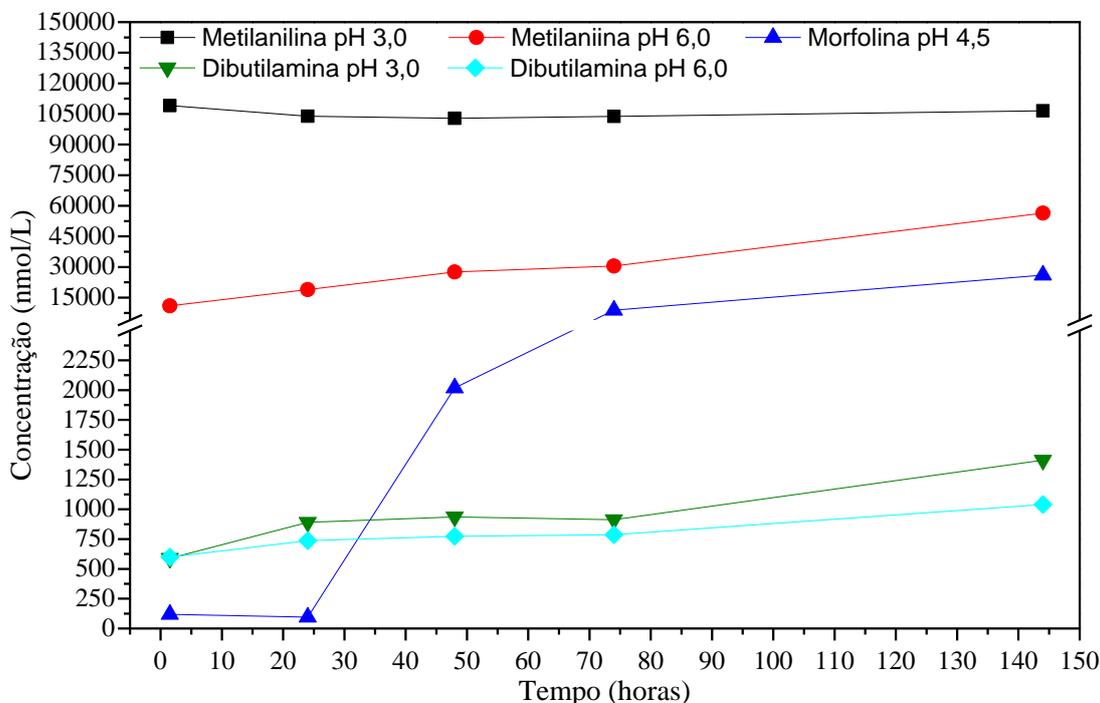
As análises cromatográficas foram realizadas com um cromatógrafo líquido modelo *Iclass Separations* (Waters, EUA) equipado com autoamostrador, bomba binária, forno de coluna e sistema de desgaseificação, acoplado a um detector de espectrometria de massas Xevo TQ-Sµ com fonte de ionização APCI (Waters, Inglaterra) operando em modo de monitoramento de reações múltiplas (MRM, do inglês Multiple Reaction Monitoring). A aquisição e o

tratamento dos dados foram realizados com o software MassLynx®, versão 4.2 (Micromass, Manchester, Reino Unido).

## Resultados e Discussão

Para entender a reação de nitrosação e propor medidas de mitigação de nitrosaminas, a cinética de nitrosação de aminas secundárias em solução foi avaliada. Sabe-se que a cinética de reação das nitrosaminas é influenciada pelo pH do meio reacional, bem como pelo pKa das aminas envolvidas. Na Figura 1 é possível observar com mais detalhes a influência desses parâmetros físico-químicos na formação de NMPPhA, NMOR e NDBA. Foi observado que a metilanilina (pKa 4,68) reagiu prontamente na presença de 10 µg/mL de nitrito em pH 3,0, com uma conversão para NMPPhA em torno de 100% após 1h30 min de reação. Enquanto em pH 6,0, para o mesmo tempo de reação, houve uma conversão em torno de 10%, atingindo 52% de conversão somente após 6 dias. Para a morfolina (pKa 8,015) em pH 4,5, observou-se que a reação é mais lenta, com uma taxa de conversão para NMOR após 6 dias em torno de 25%. Enquanto a dibutilamina (pKa 11,35) apresentou conversão para NDBA próxima a 1%, independentemente do pH e do tempo de reação. Portanto, é possível concluir que a influência do pH na cinética de nitrosação é mais significativa para aminas com menor pKa. Portanto, para aminas mais ácidas, o ajuste do pH do medicamento final para valores maiores que 4,5 é de fundamental importância para a mitigação de nitrosaminas.

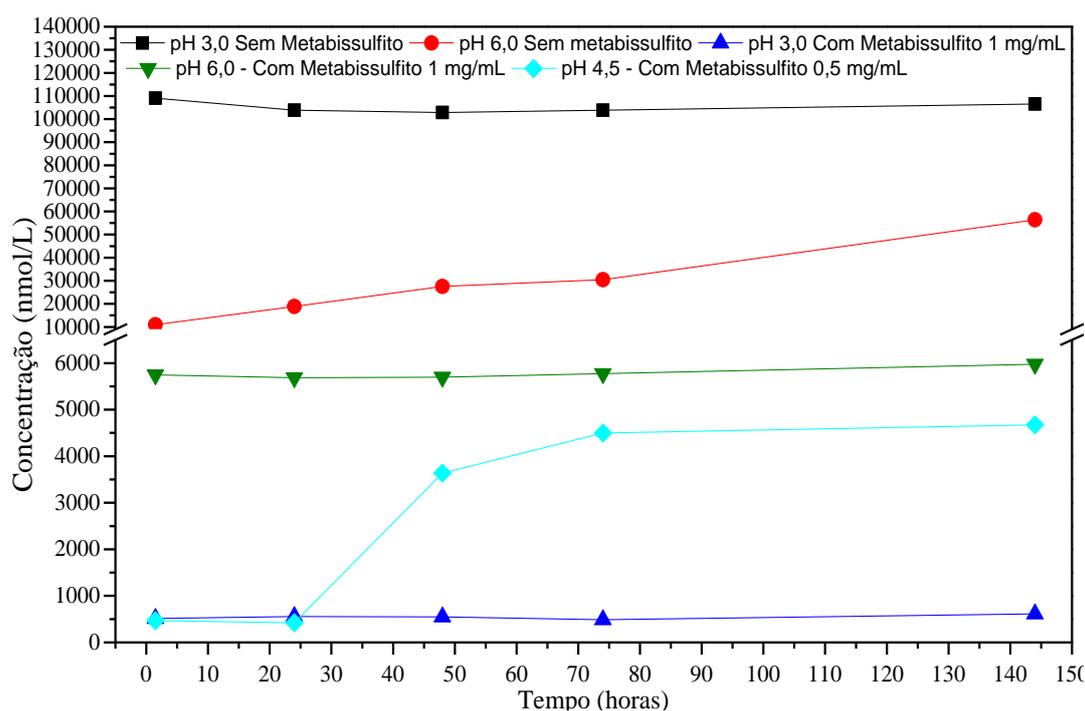
**Figura 1:** Resultados obtidos para avaliação do efeito do pKa das aminas e pH do meio reacional na reação de nitrosação.



Para avaliar o potencial do metabissulfito de sódio como mitigador da nitrosação, foram realizados experimentos em diferentes pHs, aminas e concentrações de metabissulfito usando um delineamento de face centrada. Na Figura 2 são apresentados os resultados obtidos para a conversão de metilanilina em NMPPhA. A mitigação de nitrosaminas é mais evidente em pH ácido, no qual houve inibição de cerca de 99% da reação de nitrosação. Isso pode ser explicado pela natureza ácida do metabissulfito, sendo parcialmente protonado em pH 3,0.

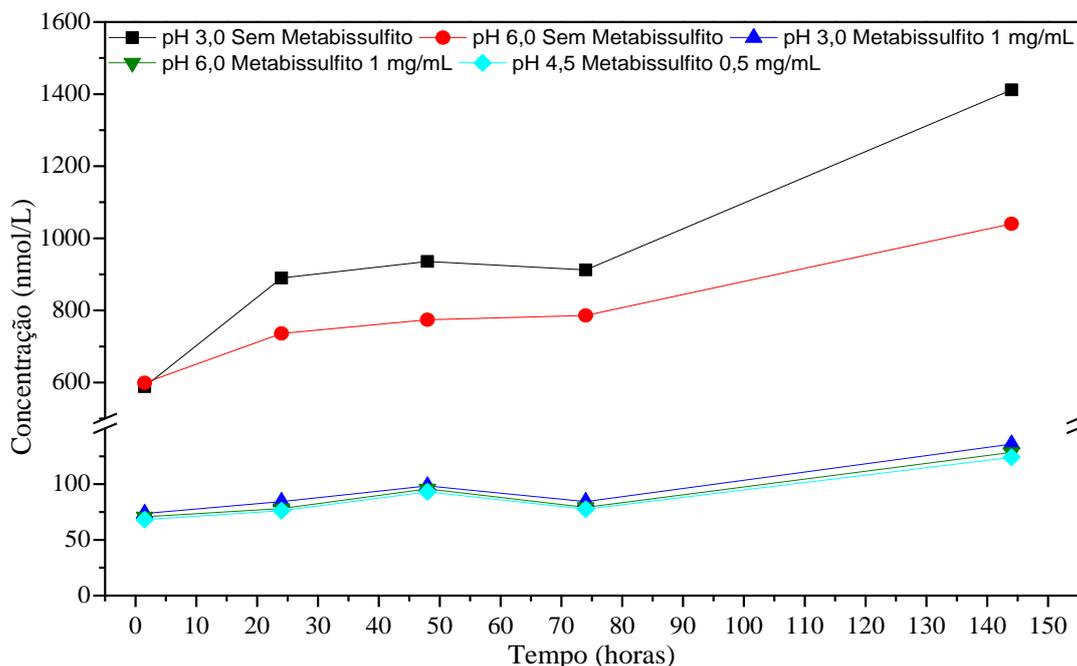
Em pH 6,0, como mostrado na figura 1, a reação de nitroação é mais lenta e, ainda assim, a adição de metabissulfito levou a uma inibição de cerca de 90% da reação (Figura 2). O potencial antioxidante do metabissulfito, é reduzido em valores de pH a partir de 4,5, uma vez que mais de 99% das espécies de metabissulfito são desprotonadas. Além do pH do meio, outro parâmetro que demonstrou influência significativa na inibição da nitroação foi a concentração de metabissulfito. Para aminas com menor pKa, como a metilanilina, é necessária uma maior quantidade de metabissulfito para inibir a nitroação.

**Figura 2:** Avaliação da inibição da nitroação de metilanilina pela ação de metabissulfito.



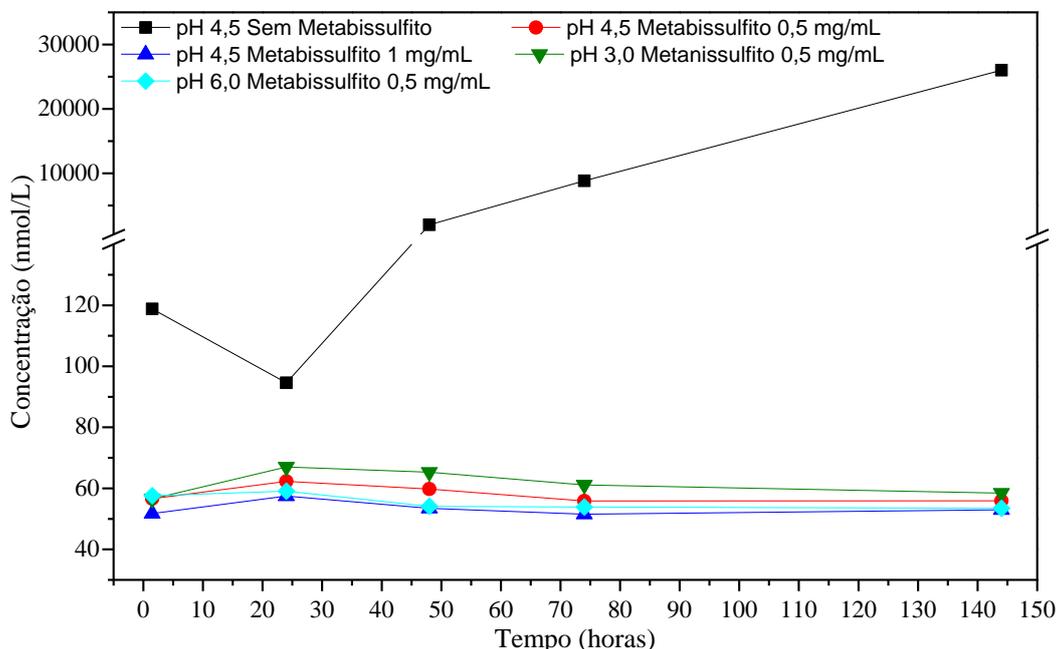
Em relação à inibição da nitroação de dibutilamina pela ação do metabissulfito, independente do pH, houve uma redução em torno de 90%, demonstrando uma aplicabilidade também para aminas com maiores pKa. Diferentemente da metilanilina (pKa 4,68), para a dibutilamina (pKa 11,35), a concentração de metabissulfito não teve influência significativa na inibição da reação de nitroação, pois mesmo em pH 6,0, houve inibição de mais de 90% da reação utilizando 0,5 mg/mL de metabissulfito, conforme representado na Figura 3.

**Figura 3:** Avaliação da inibição da nitroação de dibutilamina pela ação de metabissulfito.



Em relação à morfolina (pKa 8,015), a inibição da nitroação pelo metabissulfito foi satisfatória, pois houve redução de aproximadamente 99% em todas as condições avaliadas após 6 dias de reação (Figura 4). Assim como a dibutilamina, a conversão da morfolina para NMOR é mais lenta devido à menor reatividade da amina. Ao avaliar a influência da concentração do metabissulfito, observou-se que este não influenciou significativamente na inibição da reação. Assim, o metabissulfito mostrou-se um bom agente sequestrador de nitrito e inibidor da reação de nitroação, sendo dependente do pH quando exposto a aminas de menor pKa e independente do pH para aminas mais alcalinas. Esta é uma opção importante para a mitigação de nitrosaminas em medicamentos uma vez que este é um dos antioxidantes mais utilizados nesse tipo de produto.

**Figura 4:** Avaliação da inibição da nitroação de morfolina pela ação de metabissulfito.



Em posse dos resultados obtidos no planejamento experimental, estes foram submetidos a uma avaliação estatística com o auxílio do software StatEase 360. Foi utilizado um intervalo de confiança de 95%, portanto, valores de p maiores que 0,05 são considerados não significativos. A avaliação mostrou quais dos parâmetros avaliados são significativamente influentes no modelo matemático obtido. Os resultados são apresentados na Tabela 1. Todos os parâmetros avaliados individualmente mostraram-se significativos para o modelo, assim como a interação pH com metabissulfito e pH com pKa.

**Tabela 1:** Avaliação ANOVA para o modelo matemático quadrático obtido com os dados do planejamento experimental de fase centrada.

Fonte	Soma dos Quadrados	Média Quadrática	F valor	P valor	Significante
<b>Modelo</b>	2.85	0.3169	12.50	0.0004	Sim
<b>pH</b>	0.0084	0.0084	0.3323	0.0057	Sim
<b>Metabissulfito</b>	0.3019	0.3019	11.90	0.0073	Sim
<b>pKa</b>	0.3657	0.3657	14.42	0.0042	Sim
<b>pH * Metabissulfito</b>	0.0127	0.0127	0.5021	0.0496	Sim
<b>pH * pKa</b>	0.0122	0,0122	0.4827	0.0500	Sim
<b>Metabissulfito * pKa</b>	0.0302	0.0302	1.19	0.3034	Não
<b>A2</b>	0.0167	0.0167	0.6588	0.0438	Sim
<b>B2</b>	0.1020	0.1020	4.02	0.0759	Sim
<b>C2</b>	0.9397	0.9397	37.05	0.0002	Sim
<b>Residual</b>	0.2283	0.0254			
<b>Falta de ajuste</b>	0.0829	0.0166	0.4560	0.7941	Não
<b>Erro Puro</b>	0.1454	0.0363			

Na Tabela 2 são apresentados os modelos matemáticos obtidos para cada tempo de reação avaliado. Portanto, a mitigação de nitrosaminas pela ação do metabissulfito foi considerada satisfatória, pois houve mais de 90% de inibição da nitrosação e é uma alternativa útil no gerenciamento do risco de nitrosaminas.

**Tabela 2:** Modelos matemáticos obtidos para avaliação de metabissulfito na mitigação de nitrosação de aminas secundárias em solução.

Modelo Matemático Quadrático	R <sup>2</sup> Ajustado	R <sup>2</sup> Predito
$\text{NNA (mmol/mL)} = 1.30 + 0.1849 \cdot [\text{Metab}] + 0.2520 \cdot \text{pKa} - 0.0453 \cdot \text{pH} \cdot [\text{Metab}] + 0.1090 \cdot [\text{Metab}] \cdot \text{pKa} - 0.1948 \cdot [\text{Metab}]^2 - 0.4495 \cdot \text{pKa}^2$	0.9727	0.7919
$\text{NNA (mmol/mL)} = 1.2453 + 0.1650 \cdot [\text{Metab}] + 0.2281 \cdot \text{pKa} + 0.1025 \cdot [\text{Metab}] \cdot \text{pKa} - 0.0781 \cdot \text{pH}^2 - 0.1566 \cdot [\text{Metab}]^2 - 0.4338 \cdot \text{pKa}^2$	0.9710	0.8055
$\text{NNA (mmol/mL)} = 1.2266 + 0.1179 \cdot [\text{Metab}] + 0.2807 \cdot \text{pKa} - 0.1149 \cdot \text{pH} \cdot [\text{Metab}] + 0.1071 \cdot \text{pH} \cdot \text{pKa} + 0.0443 \cdot \text{pH}^2 - 0.1444 \cdot [\text{Metab}]^2 - 0.5157 \cdot \text{pKa}^2$	0.9471	0.7599
$\text{NNA (mmol/mL)} = 1.2961 + 0.1741 \cdot [\text{Metab}] + 0.2247 \cdot \text{pKa} + 0.0979 \cdot [\text{Metab}] \cdot \text{pKa} - 0.1118 \cdot [\text{Metab}]^2 - 0.5744 \cdot \text{pKa}^2$	0.9668	0.7958

$$\text{NNA (mmol/mL)} = 1.2029 + \frac{0.1737 * [\text{Metab}] + 0.1912 * \text{pKa} - 0.1932 * [\text{Metab}]^2}{0.5864 * \text{pKa}^2} - 0.8518 \quad 0.6721$$

## Conclusões

Neste estudo, o potencial do uso de metabissulfito de sódio na mitigação de nitrosaminas foi demonstrado, sendo uma ferramenta útil para inibir a nitrosação de aminas secundárias em solução. Modelos matemáticos representando diferentes tempos de reação foram apresentados e os resultados demonstraram uma boa correspondência entre os valores experimentais e previstos. Portanto, a mitigação de nitrosaminas pela ação do metabissulfito foi considerada satisfatória, pois houve mais de 90% de inibição da nitrosação e é uma alternativa útil no gerenciamento do risco de nitrosaminas.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à CAPES e ao Laboratório Cristália.

## Referências

- Ashworth, I. W.; Dirat, O.; Teasdale, A.; Whiting, M., Potential for the formation of N-nitrosamines during the manufacture of active pharmaceutical ingredients: an assessment of the risk posed by trace nitrite in water. *Organic Process Research & Development* **2020**, 24 (9), 1629-1646.
- Ashworth, I. W.; Curran, T.; Dirat, O.; Zheng, J.; Whiting, M.; Lee, D., A Consideration of the Extent That Tertiary Amines Can Form N-Nitroso Dialkylamines in Pharmaceutical Products. *Organic Process Research and Development* **2023**.
- Bayne, A.-C. V.; Mistic, Z.; Stemmler, R. T.; Wittner, M.; Frerichs, M.; Bird, J. K.; Besheer, A., N-nitrosamine mitigation with nitrite scavengers in oral pharmaceutical drug products. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2023**.
- Chang, S.-H.; Chang, C.-C.; Wang, L.-J.; Chen, W.-C.; Fan, S.-Y.; Zang, C.-Z.; Hsu, Y.-H.; Lin, M.-C.; Tseng, S.-H.; Wang, D.-Y., A multi-analyte LC-MS/MS method for screening and quantification of nitrosamines in sartans. *Journal of Food Drug Analysis* **2020**, 28, 98-107.
- López-Rodríguez, R.; McManus, J. A.; Murphy, N. S.; Ott, M. A.; Burns, M. J., Pathways for N-nitroso compound formation: secondary amines and beyond. *Organic Process Research Development* **2020**, 24 (9), 1558-1585.
- Moser, J.; Ashworth, I. W.; Harris, L.; Hillier, M. C.; Nanda, K. K.; Scrivens, G., N-nitrosamine formation in pharmaceutical solid drug products: experimental observations. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2023**, 112 (5), 1255-1267.
- Nanda, K. K.; Tignor, S.; Clancy, J.; Marota, M. J.; Allain, L. R.; D'Addio, S. M., Inhibition of N-nitrosamine formation in drug products: a model study. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021**, 110 (12), 3773-3775.
- Ponting, D. J.; Dobo, K. L.; Kenyon, M. O.; Kalgutkar, A. S., Strategies for assessing acceptable intakes for novel N-nitrosamines derived from active pharmaceutical ingredients. *Journal of Medicinal Chemistry* **2022**, 65 (23), 15584-15607.
- Ponting, D. J.; Foster, R. S., Drawing a Line: Where Might the Cohort of Concern End? *Organic Process Research and Development* **2023**.
- Schlingemann, J.; Burns, M. J.; Ponting, D. J.; Avila, C. M.; Romero, N. E.; Jaywant, M. A.; Smith, G. F.; Ashworth, I. W.; Simon, S.; Saal, C., The landscape of potential small and drug substance related nitrosamines in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **2023**, 112 (5), 1287-1304.
- Teasdale, A., ICH M7: Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk. *ICH quality guidelines: an implementation guide* **2017**, 667-699.
- Thresher, A.; Gosling, J. P.; Williams, R. J. T. r., Generation of TD50 values for carcinogenicity study data. **2019**, 8 (5), 696-703.
- Wagner, J. A.; Dinh, J. C.; Lightdale, J. R.; Gold, B. D.; Colombo, J. M., Is this the end for ranitidine? NDMA presence continues to confound. *Clinical and Translational Science* **2021**, 14 (4), 1197.