



Producto inesperado de la solvatación de sultamicilina en DMSO

Pierre Anderson, Sonia Koteich-Khatib, Juan Manuel Amaro-Luis y AliBahsas*

Laboratorio de Productos Naturales - Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear
Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes. Mérida 5101, Venezuela

(*) bahsas@ula.ve

Recibido: 17/06/2015

Revisado: 05/08/2015

Aceptado: 25/08/2015

Resumen

Se obtuvieron nuevo e inesperado producto de degradación de la sultamicilina base mientras se realizaba el análisis y control de calidad de esta materia prima en disoluciones de dimetil-sulfóxido-deuterado. El nuevo compuesto fue caracterizado por RMN-¹H, RMN-¹³C (BB y DEPT) y RMN-2D, e identificado como (3*R*,6*R*,9*R*,19*S*,22*R*)-20,20-dimetil-6-fenil-13-(propan-2-ilideno)-15,17-dioxa-8,21-ditio-1,4,7,12-tetraazatetraciclo[17.3.0.0^{3,22}.0^{9,12}]docosano-2,5,11,14,18-pentanona-8,8-dioxido.

Palabras clave: sultamicilina; control de calidad; estabilidad en DMSO; degradación; análisis por RMN.

Abstract

A new and unexpected product was obtained from degradation of sultamicillin base while performing an analysis and quality control of dimethyl sulfoxide dissolution of this drug. The new compound was characterized by ¹H-NMR, ¹³C-NMR (BB & DEPT) and 2D-NMR, and was identified as (3*R*,6*R*,9*R*,19*S*,22*R*)-20,20-dimethyl-6-phenyl-13-(propan-2-ylidene)-15,17-dioxa-8,21-dithia-1,4,7,12-tetraazatetracyclo [17.3.0.0^{3,22}.0^{9,12}]docosane-2,5,11,14,18-pentane 8,8-dioxide

Keywords: Sultamicillin; Quality control; Stability in DMSO; Degradation; NMR analysis.

Introducción

La sultamicilina, químicamente conocida como (2*S*,5*R*)-(((2*S*,5*R*,6*R*)-6-((*R*)-2-amino-2-fenilacetamido)-3,3-dimetil-7-oxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carbonil)oxi) metilen-3,3-dimetil-4,4,7-trioxo-4-tia-1-azabicyclo[3.2.0]heptano-2-carboxilato (figura 1), es un profármaco doble éster mutuo, constituido por sulbactam, un inhibidor irreversible de β-lactamasas, y la ampicilina, un antibiótico conocido de amplio espectro. Este medicamento, desarrollado por Pfizer™ en 1987, comercializado como Unasyn®, se ha convertido en uno de los antibióticos de más amplio espectro, ideal en el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio, la piel, los tejidos blandos y del tracto urinario, así como también en varias afecciones bacterianas ocasionales, tanto en ginecología como en obstetricia¹. La sultamicilina, administrada oralmente, es absorbida con eficacia desde el tracto gastrointestinal (pared intestinal), con una biodisponibilidad del 80%, superando la biodisponibilidad del sulbactam y la ampicilina cuando se administran oralmente separados o juntos sin la unión por el grupo metileno². Luego de la absorción, es rápidamente hidrolizada para liberar cantidades equimolares de la ampicilina y el sulbactam en el sistema circulatorio, distribuyéndose así en una amplia variedad de tejidos y fluidos corporales^{1,4}. El tratamiento con sultamicilina es la primera

opción en el caso de una gran variedad de infecciones pediátricas, incluyendo aquellas infecciones bacterianas resistentes, causadas por micro-organismos productores de β-lactamasas^{5,6}. Además, el tratamiento con la sultamicilina presenta un bajo índice de efectos secundarios, siendo las afecciones estomacales las más notables^{1,4}.

El control de calidad de principios farmacológicamente activos, incluye diversos tipos de análisis, como por ejemplo, uniformidad de contenido, control de calidad y pureza, pruebas de disolución, entre otros. Las impurezas pueden originarse de diversas formas, lo que las hace, a veces, muy difícil de identificar. Sin embargo, la mayor cantidad de impurezas se generan durante el proceso de síntesis del principio activo, las cuales podrían deberse al último intermediario del proceso sintético, productos de reacción incompleta, productos de sobre-reacción, impurezas en los materiales de partida, impurezas procedentes de los solventes utilizados o de los catalizadores, productos de degradación o reacciones secundarias, impurezas enantioméricas, solventes residuales, impurezas inorgánicas, o en excipientes y polimorfos⁷. Existen diversos trabajos que describen los aspectos metodológicos de perfiles de impurezas, desde la detección a la identificación/elucidación de la estructura y la determinación cuantitativa⁸, problemas de validación de los métodos de ensayo^{9,10}, así

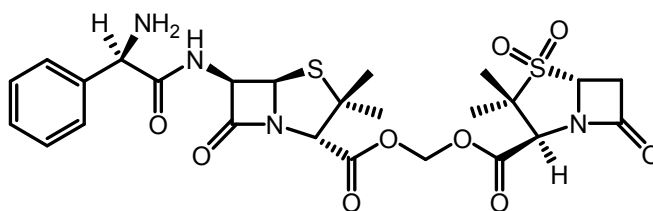


Fig. 1: Estructura de la sultamicilina.

como el rol de las impurezas en la seguridad de la terapia medicamen-tosa¹¹.

En el Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear, de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes, se ha venido desarrollando una línea de investigación centrada en la capacidad y versatilidad que muestra esta técnica en el control de calidad de principios activos, de medicamentos de uso común. La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una poderosa técnica para determinar las estructuras moleculares de compuestos orgánicos, incluyendo proteínas y polímeros; y en la elaboración de medicamentos es útil para detectar y cuantificar impurezas y trazas de solventes que se encuentran contaminando los principios activos, el producto en proceso o el producto terminado^{12,13}.

Durante el transcurso de un análisis de impurezas y control de calidad de la sultamicilina realizado en nuestro laboratorio, mediante RMN, se observó que cuando la misma se disuelve en dimetil-sulfóxido-deuterado, comienza a descomponerse al cabo de unos minutos, generando su completa transformación en otro compuesto desconocido, después de 24 horas. En este trabajo de investigación se propone a la RMN como una técnica altamente eficaz y precisa en la identificación de impurezas orgánicas en materias primas de un producto farmacológicamente activo como la sultamicilina, así como su capacidad de elucidar la estructura completa de la misma.

Materiales y métodos

Se disuelven 20 mg de sultamicilina base en 0,500 mL de dimetil-sulfóxido-deuterado Merck™ (DMSO-*d*₆). Los espectros RMN-¹H se realizaron a los 5 minutos de completar la disolución y se registró otro espectro luego de transcurridas 5 horas, tiempo necesario y suficiente para adquirir los espectros de RMN-¹³C *Broad Band* (BB) y *Distorsionless Enhanced Polarization Transfer* (DEPT-135) y los espectros bidimensionales *Correlation Spectroscopy* (COSY), *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation* (HMQC) y *Heteronuclear Multiple Bond Correlation* (HMBC). Los experimentos de RMN fueron realizados en un equipo Bruker-Avance DRX400 a la frecuencia de operación de 400 MHz para el ¹H y 100 MHz para el ¹³C.

Resultados y discusión

La sultamicilina base es soluble en la mayoría de los solventes utilizados en RMN, y sólo ligeramente soluble en D₂O y en benceno-*d*₆ (C₆D₆). Las disoluciones en todos los solventes, excepto CDCl₃ y C₆D₆, tienen estabilidad limitada. En el caso del DMSO-*d*₆, la descomposición es instantánea y progresiva. Estos resultados indican que, en principio, existen ciertas limitaciones para utilizar la espectroscopia de RMN, como una buena herramienta para el control de calidad de la sultamicilina (figura 2). El uso de estos solventes en su síntesis también tiene limitaciones

Como puede apreciarse en la figura 3, apenas se comienza a registrar el espectro de RMN-¹H de la sultamicilina en DMSO-*d*₆, empiezan a aparecer nuevas señales alrededor de 2 ppm, y al cabo de unas horas, se observa una transformación acelerada de la sultamicilina en un nuevo compuesto, lo cual imposibilita la asignación inequívoca de las señales (figura 3). En consecuencia, para caracterizar el producto de transformación, recurrimos a un estudio comparativo de los espectros de RMN-¹H de la sultamicilina transformada, frente a los de la sultamicilina pura.

Al observar los datos de RMN, adquiridos después de 24 horas, la sultamicilina disuelta en DMSO-*d*₆ se convierte en un nuevo compuesto (figura 4).

Al comparar el espectro de RMN-¹H de este nuevocompuesto (figura 4), con el de la sultamicilina, es posible identificarlas señales que se conservan, aunque sus desplazamientos químicos cambian ligeramente, por lo que se identificaran con letras “primas”. La primera señal del espectro es un doblete (A') que se acopla con la señal del protón E', el cual se acopla a su vez con F'. El singulete ancho (S') es una señal nueva, correspondiente a un hidrógeno conectado a un heteroátomo. El sistema aromático (doblete B' y tripletes C' y D') conservan su intensidad e integran aún para cinco protones, pero su multiplicidad se modificó con respecto a la observada en el compuesto original, detectándose una superposición de las señales C' y D'. Las resonancias Q' y R' aparecen en el mismo rango de sus análogos del compuesto original, así como también las señales E' y F'. Mientras que K', M' y N' se asignaron a hidrógenos integrantes de un sistema ABX similar al de la sultamicilina. Un cambio notable es la desaparición de uno de los tres singuletes atribuido a los protones metínicos de la sultamicilina (G,

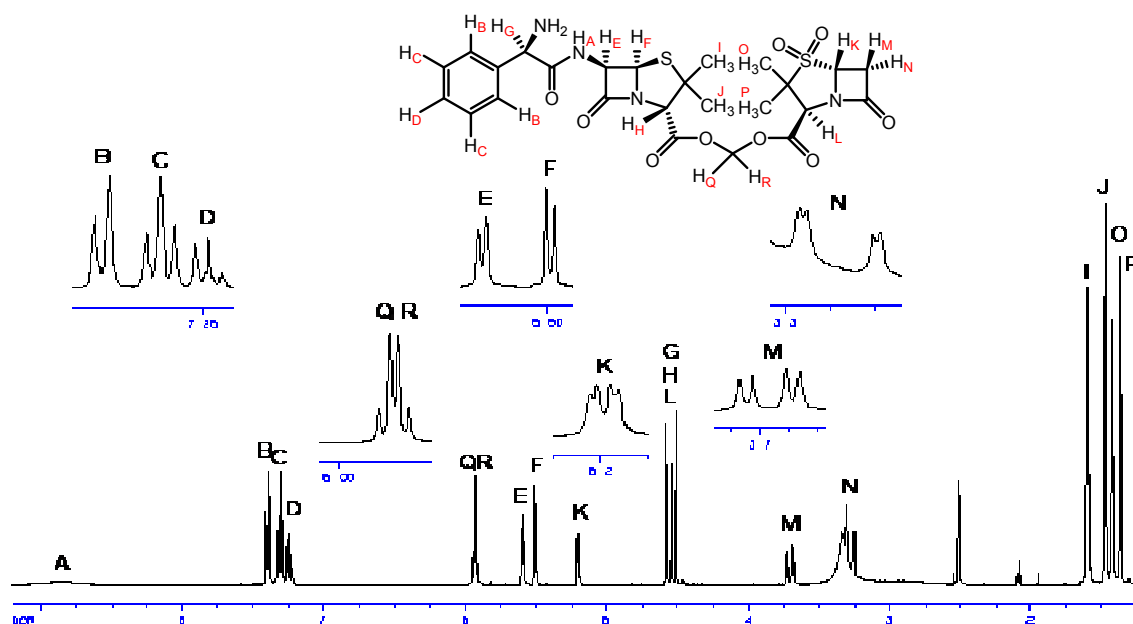


Fig. 2: Espectro RMN- ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) de la sultamicilina.

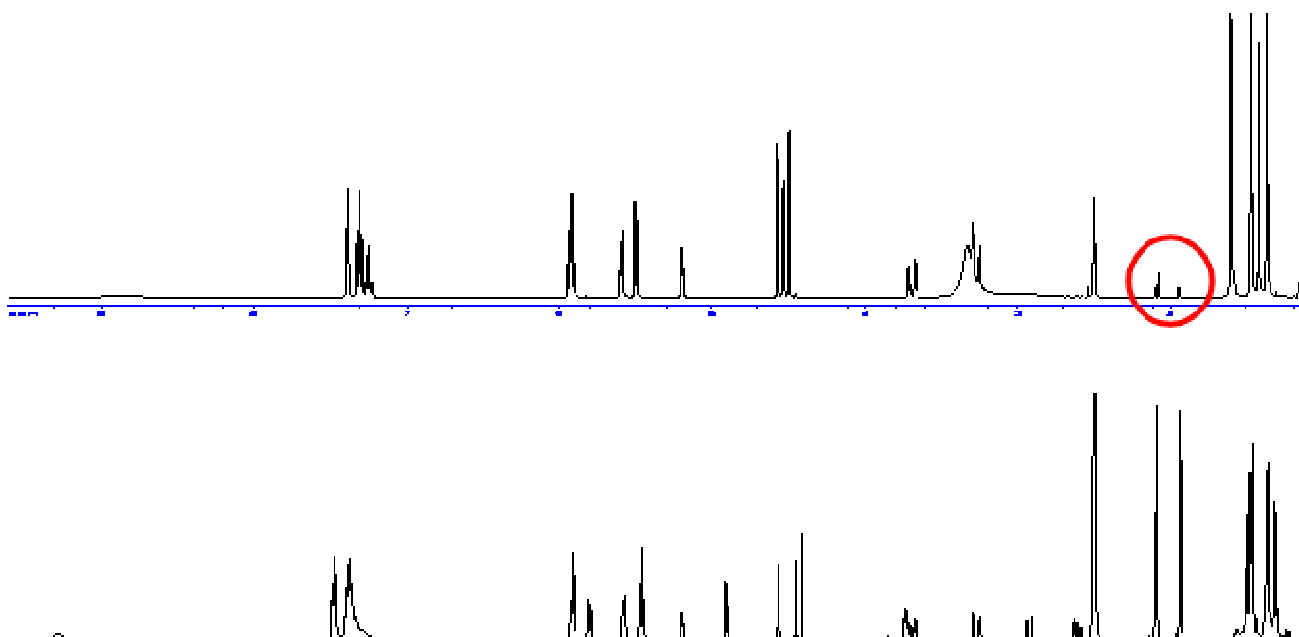


Fig. 3: Espectro RMN- ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) de la sultamicilina registrado a los 5 min (arriba) y a las 5h (abajo).

H, L), quedando de esta forma sólo dos singletes, los cuales se identificaron con las letras T' y U'. Dos de las cuatro señales de los metilos que aparecían en el espectro de la sultamicilina en el rango de 1,6-1,3 ppm, se desplazaron a campo bajo (entre 2,08 y 1,93 ppm), indicando que ahora son metilos unidos a carbonos sp^2 ; sin embargo, el espectro de RMN- ^1H no permite asegurarse cuáles metilos corresponden los singletes que se han desplazado, y por ello estas señales se denotaron con las letras V', X', Y', Z'.

El espectro COSY- ^1H , ^1H (figura 5) confirma estos acoplamientos, y aporta información adicional de interacciones débiles que no son visibles en el espectro RMN- ^1H . Es el

caso de la interacción T'-B' lo cual sugiere que el protón T' es bencílico; además se observan los acoplamientos V'-X' y Y'-Z' de los diferentes metilos geminales. Igualmente se conservan las señales de los hidrógenos del anillo aromático, observándose sólo un ligero cambio en la resonancia del H *para*, que se superpone con la de los hidrógenos *meta*.

Los protones Q' y R', del puente metilénico, no sufren grandes cambios en su desplazamiento, pero la separación entre sus resonancias aumenta. Las señales de los protones K', M' y N', que conforman el sistema ABX, se desplazan a campo más alto, pero de igual manera identifican a los protones de un anillo β -lactámico, idéntico al del sulbactam.

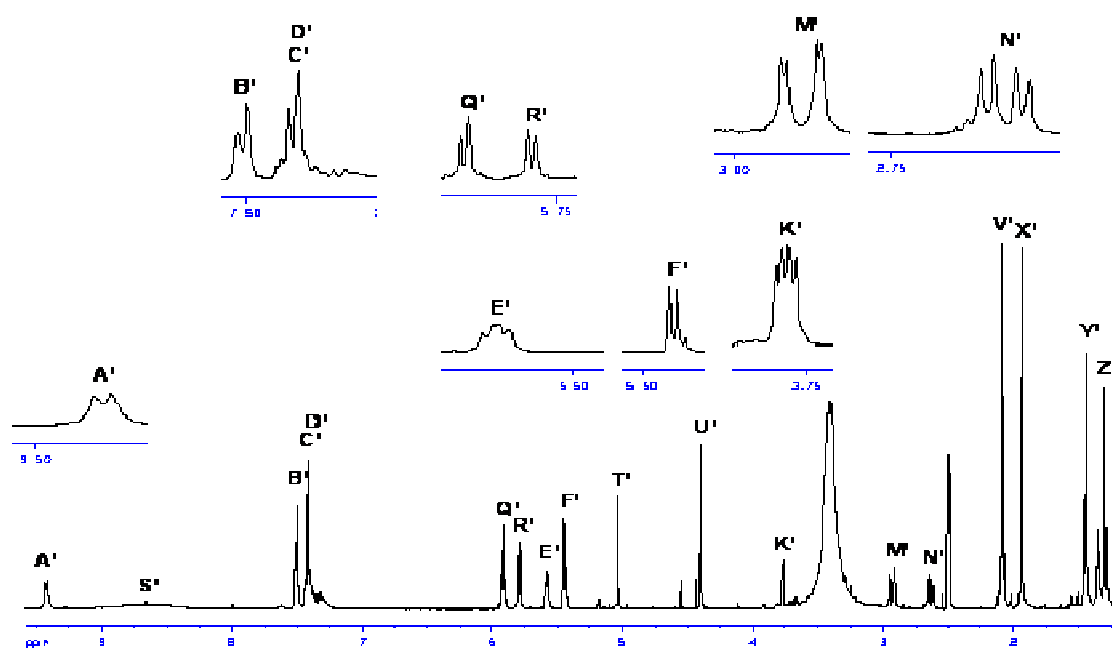


Fig. 4: Espectro de RMN- ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) del compuesto desconocido.

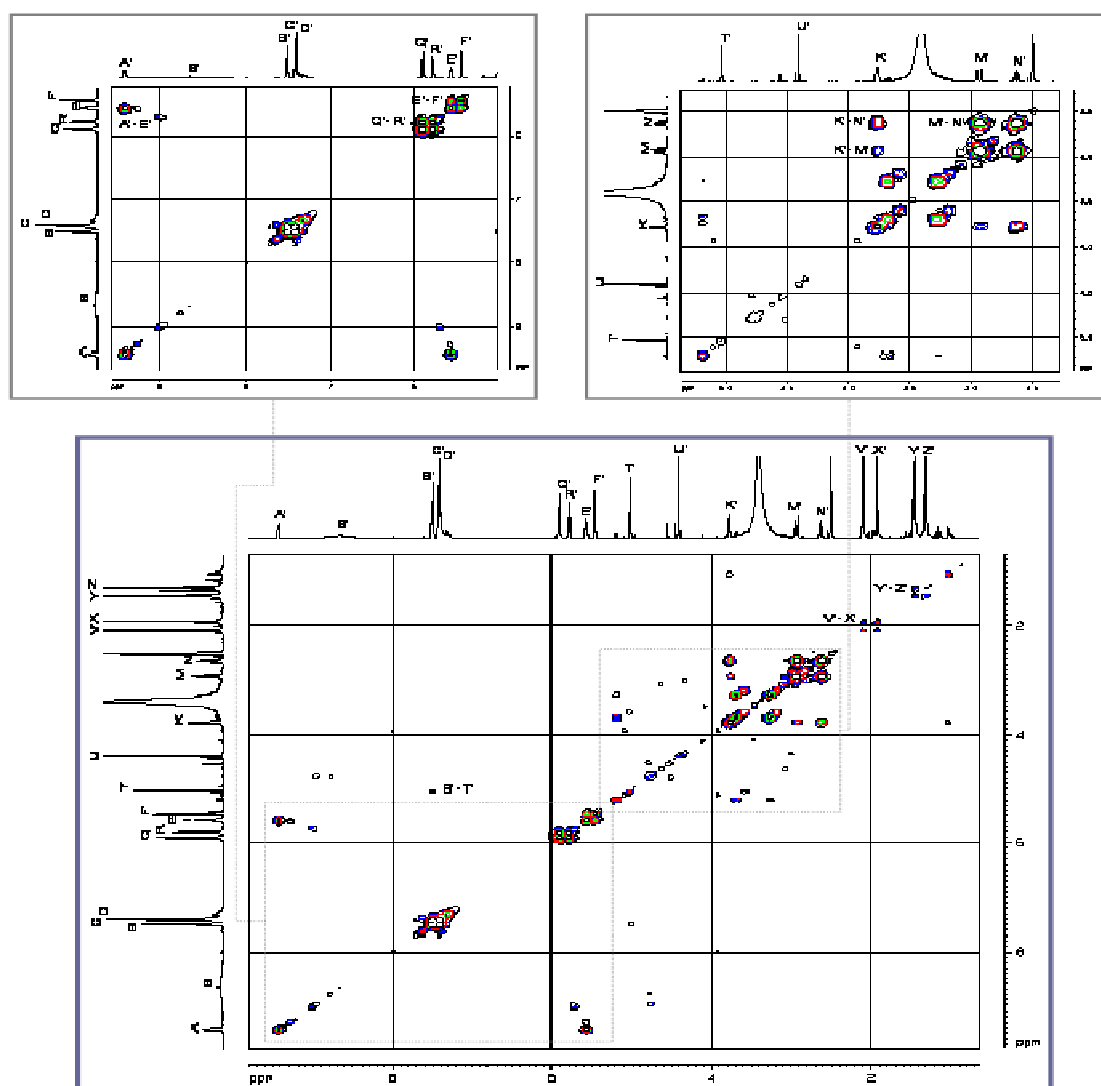


Fig.5: Espectro COSY- ^1H del compuesto desconocido.

Al comparar el espectro RMN- ^1H del compuesto desconocido con el de la sultamicilina, podemos observar los cambios de señales, producto de la descomposición (figura 6). El sistema de espín A', E' y F' no sufre modificaciones sustanciales, y ello se pone también en evidencia en el espectro COSY- ^1H , ^1H , en el cual persisten las correlaciones A'-E' y E'-F'.

En el espectro de RMN- ^1H del nuevo compuesto, dos de las señales de los metilos (V' y X') se desplazan hasta los 2 ppm; y sólo se observan dos (T' y U'), de los tres singuletes (G, H, L) que integran para un protón cada uno en el espectro de la sultamicilina, con lo cual es evidente que desaparece un hidrógeno. Si a esto se suma el hecho de que en el espectro de RMN- ^{13}C se detectan dos nuevas señales propias de carbonos sp^2 (29 y 34 ppm), es lógico suponer que en la transformación surgió una eventual β -eliminación. La correlación B'-T' en el espectro COSY- ^1H , ^1H demuestra que al protón bencílico debe asignársele la señal que se desplaza a campo más bajo (≈ 0.5 ppm) identificada como T' (que se correspondería con la señal G en la sultamicilina); en consecuencia es la señal de uno de los protones H ó L, la que desaparece en el proceso de transformación.

En el HMBC del nuevo compuesto (figura 7) podemos notar la correlación del singulete U' con los picos f', y' y z', entre los cuales sólo se encuentra asignado con seguridad el f', que corresponde a un carbono análogo al carbono β en el anillo β -lactámico de la ampicilina. Esto permite sugerir que

el hidrógeno L desaparece en la transformación. Las correlaciones Q'-26 y R'-26, indican que en este nuevo compuesto existe un puente conector similar al de la sultamicilina.

Cabe resaltar que las correlaciones HMBC, no permiten obtener conclusiones definitivas en torno a la estructura del compuesto. Es por ello que se propone una posible reacción de descomposición. El mecanismo propuesto, radica sobre la base de que el DMSO actúa como un agente oxidante que atrapa al hidrógeno α al grupo carboxilo del núcleo del sulbactam, induciendo la ruptura del enlace C-S en la sulfona y la formación de un nuevo enlace entre el azufre de la sulfona y el del DMSO (ver figura 8). El ataque de la amina del residuo de ampicilina sobre el azufre de la sulfona seguido por la eliminación de sulfuro de dimetilo y agua completaría el proceso.

El compuesto formado por esta reacción es un tetraciclo de 22 miembros. En esta estructura se justificarían los desplazamientos de las señales t' y T', asignadas al carbono bencílico de la ampicilina y a su respectivo hidrógeno. De igual manera, los desplazamientos a campos más altos de las señales del carbono "ipso" del núcleo bencénico (30) y del carbonilo de la amida (25) son entendibles en esta estructura. Así como también, una revisión de las correlaciones y desplazamientos químicos de los átomos en el anillo β -lactámico conectado al carbono 34, muestra, entre otras cosas, acoplamientos K'-27, M'-27 y M'-k', losque corresponden bien con la estructura propuesta.

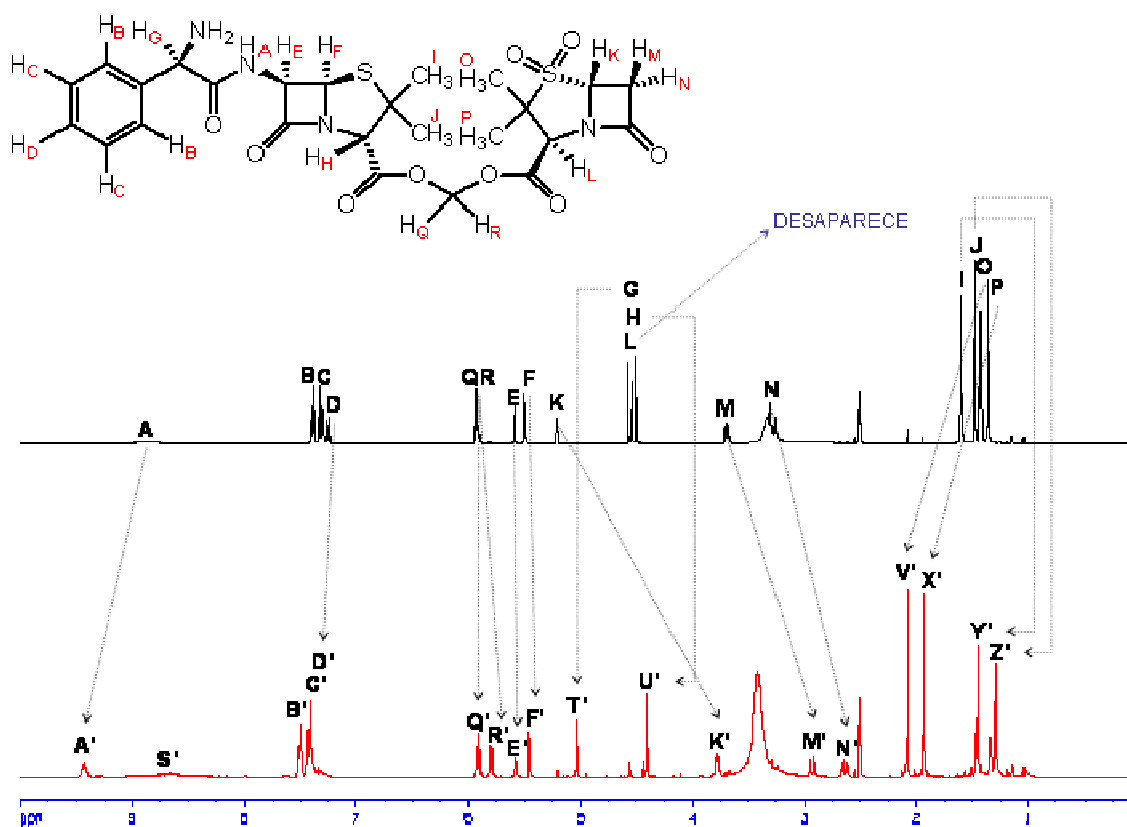


Fig. 6: Comparación de los espectros RMN- ^1H del compuesto desconocido y de la sultamicilina.

En conclusión, la estructura que se propone para el compuesto formado al disolver la sultamicilina en DMSO- d_6 , es la representada en la figura 9. En ella se incluyen los valores de los desplazamientos químicos de todas las señales observadas en sus espectros de RMN y corres-

ponde al nombre IUPAC de: (3*R*,6*R*,9*R*,19*S*,22*R*)-20,20-dimetil-6-fenil-13-(propan-2-ilideno)-15,17-dioxa-8,21-ditia-1,4,7,12-tetraazatetraciclo[17.3.0.0^{3,22}.0^{9,12}] docosano-2,5,11,14,18-pentanona-8,8-dioxido.

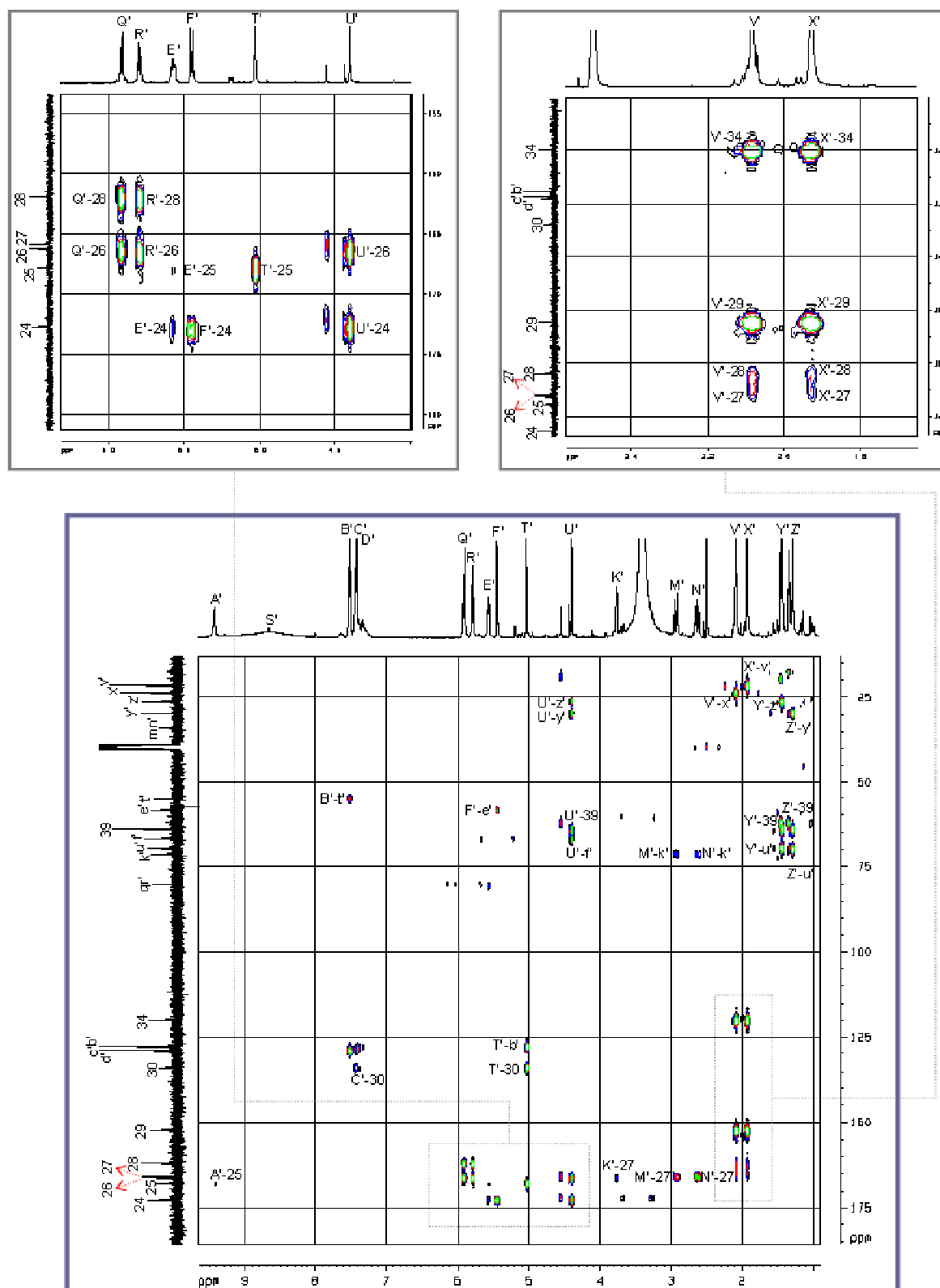


Fig.7: Espectro HMBC del compuesto desconocido.

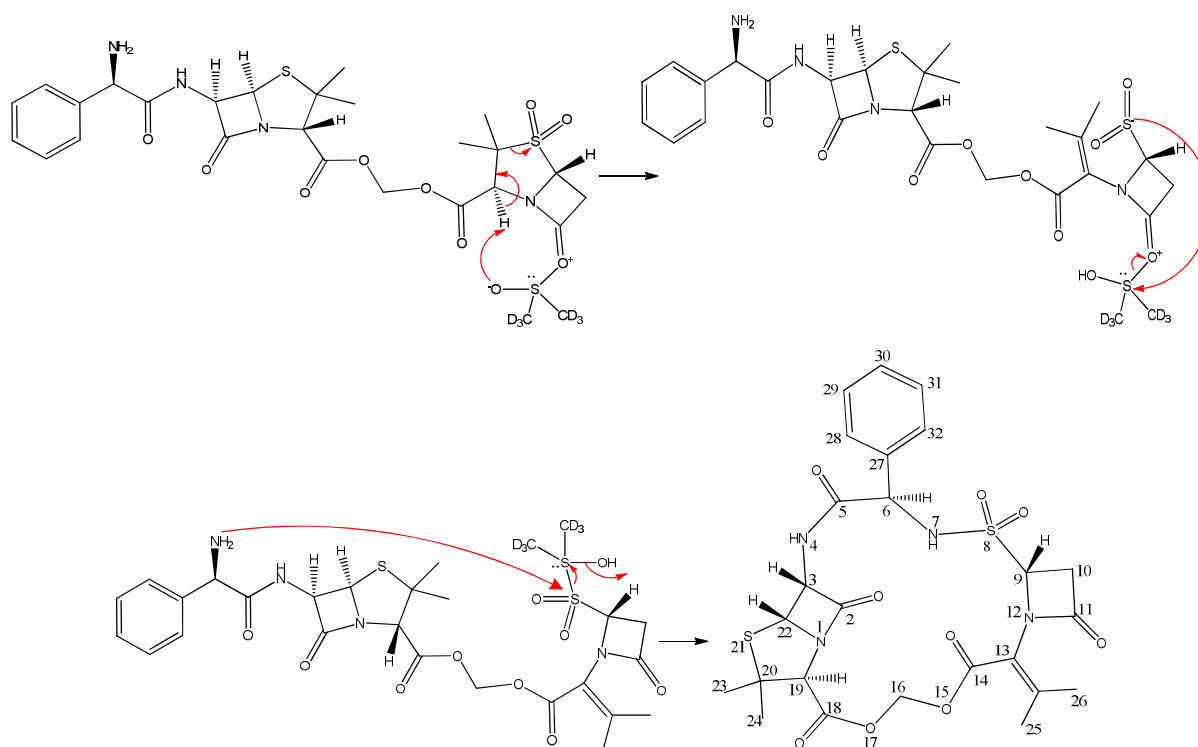


Fig. 8: Mecanismo propuesto para la obtención del compuesto desconocido.

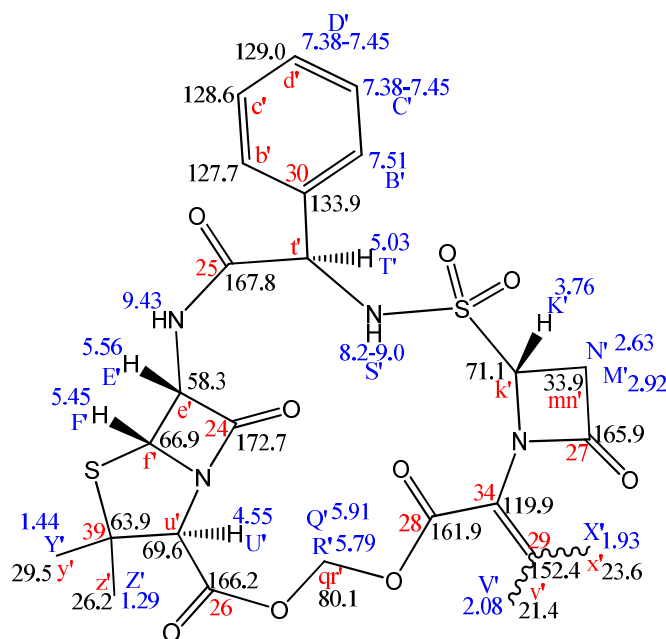


Fig. 9: Estructura del producto inesperado con señales asignadas. Letras minúsculas y números enteros en color rojo corresponden a la numeración de los carbonos en el espectro RMN- ^{13}C ; es importante mencionar que no se correlacionan con la numeración de la nomenclatura IUPAC. Los números con una sola cifra decimal y de color negro son asignados a los desplazamientos químicos en ppm de los carbonos; mientras que las letras mayúsculas y color azul corresponden a la numeración de los hidrógenos y su desplazamiento químico está dado en ppm con cifras centesimales.

Conclusiones

Se confirmó de manera inequívoca que la sultamicilina base se descompone gradualmente cuando se disuelve en $\text{DMSO}-d_6$, transformándose en un único producto. La descomposición se completa al cabo de 24 horas.

A través de este estudio se demostró, una vez más, que la RMN de alto campo (uni- y bidimensional), es una técnica poderosa para la determinación estructural de los productos que se generan en las reacciones orgánicas, máxime cuando la misma se usa en combinación de los conocimientos y de

las propuestas lógicas, relativas a los mecanismos de las reacciones orgánicas.

Se debe evitar el uso del dimetil-sulfóxido deuterado en el análisis y el control de calidad de la sultamicilina debido a su descomposición en este solvente. El solvente más adecuado para este fin es el cloroformo deuterado CDCl_3 , ya que la sultamicilina disuelta en éste permanece inalterada durante semanas.

Referencias

1. L Laviana, F Fernández-Marí, M Bayod, D Blanco. HPLC for in-process control in the production of sultamicillin. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, **36**, 321-328 (2002)
2. AR English, D Girard, SL Haskell. Pharmacokinetics of Sultamicillin in Mice, Rats, and Dogs. **Antimicrob. Agents Chem.**, **25**(5), 599-602. (1984).
3. AR English, D Girard, VJ Jasys, RJ Martingano, MS Kellogg. Orally Effective Acid Prodrugs of the β -Lactamase Inhibitor Sulbactam. **J. Med. Chem.**, **33**, 344-347 (1990).
4. H Lode. Role of sultamicillin and ampicillin/sulbactam in the treatment of upper and lower bacterial respiratory tract infections. **Int. J. Antimicrob. Agents**, **18**, 199-209 (2001).
5. D Adam. β -lactam antibiotics: their role in the management of infections in children. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **17**(3), S4-S7 (1998).
6. CM Alpuche Aranda, β -lactamase production and the role of ampicillin/sulbactam. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, **17**(3), S8-S11 (1998).
7. PD Tzanavaras, Recent Advances in the Analysis of Organic Impurities of Active Pharmaceutical Ingredients and Formulations: A Review. **Curr. Org. Chem.**, **14**, 2348-2364 (2010).
8. S Gorog, Chemical and analytical characterization of related organic impurities in drugs. **Anal. Bioanal. Chem.**, **377**, 852-862 (2003).
9. JD Orr, IS Krull, ME Swartz. Validation of Impurity Methods, Part I. LC-GC North America, 21, 626-633 (2003).
10. JD Orr, IS Krull, ME Swartz, M.E. Validation of Impurity Methods, Part II. LC-GC North America, 21, 1146-1152 (2003).
11. S Gorog, The importance and the challenges of impurity profiling in modern pharmaceutical analysis. **Trends Anal. Chem.**, **25**, 755-757, 2006.
12. JB Lambert, HF Shurvell, DA Lightner, R Graham Cooks. Organic Structural Spectroscopy. Prentice-Hall Inc., New Jersey (1998).
13. TDW Claridge. High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry. Tetrahedron Organic Chemistry Series, Vol. 19. Elsevier (1999)