

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

AMANDA LAYLLA SILVA PAIVA
PAULO HENRIQUE SILVA DE PAIVA

**CONTAMINAÇÃO DE MEDICAMENTOS POR N-NITROSAMINAS: BASES
REGULATÓRIAS PARA CONTROLE**

GOIÂNIA

2022



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)

Nome(s) completo(s) do(a)(s) autor(a)(es)(as): Amanda Laylla Silva Paiva e Paulo Henrique Silva de Paiva
Título do trabalho: Contaminação de medicamentos por N-nitrosaminas: Bases regulatórias para controle

2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento SIM [] NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(a)(s) autor(a)(es)(as) e ao(a) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Junior Neves, Professor do Magistério Superior**, em 05/04/2022, às 14:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **PAULO HENRIQUE SILVA DE PAIVA, Discente**, em 08/04/2022, às 15:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **AMANDA LAYLLA SILVA PAIVA, Discente**, em 08/04/2022, às 16:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2764671** e o código CRC **C4AA3060**.

AMANDA LAYLLA SILVA PAIVA
PAULO HENRIQUE SILVA DE PAIVA

**CONTAMINAÇÃO DE MEDICAMENTOS POR N-NITROSAMINAS: BASES
REGULATÓRIAS PARA CONTROLE**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao curso de Farmácia da
Universidade Federal de Goiás sob
orientação do Orientador: Prof. Dr.
Bruno Junior Neves.

GOIÂNIA

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Paiva, Amanda Laylla Silva

CONTAMINAÇÃO DE MEDICAMENTOS POR N-NITROSAMINAS:
BASES REGULATÓRIAS PARA CONTROLE [manuscrito] / Amanda
Laylla Silva Paiva, Paulo Henrique Silva de Paiva. - 2022.
XL, 40 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Bruno Junior Neves.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade
Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Farmácia, Goiânia,
2022.

Bibliografia.

Inclui siglas, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Impurezas. 2. N-nitrosaminas. 3. Carcinogenicidade. 4. Avaliação
de risco. 5. Medicamentos. I. Paiva, Paulo Henrique Silva de. II.
Neves, Bruno Junior, orient. III. Título.

CDU 615.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE FARMÁCIA

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos cinco dias do mês de abril do ano de dois mil e vinte e dois iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado "Contaminação de medicamentos por N-nitrosaminas: Bases regulatórias para controle", de autoria de Amanda Laylla Silva Paiva e Paulo Henrique Silva de Paiva, do curso de Farmácia, da Faculdade de Farmácia da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo Prof. Dr. Bruno Junior Neves com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Me. Sabrina Silva Mendonça (FF/UFG) e Dra. Joyce Villa Verde Bastos Borba (UNICAMP). Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição dos estudantes. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de **(9,0)**, tendo sido o TCC considerado **(APROVADO)**.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Junior Neves, Professor do Magistério Superior**, em 05/04/2022, às 15:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **JOYCE VILLA VERDE BASTOS BORBA, Usuário Externo**, em 05/04/2022, às 15:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **SABRINA SILVA MENDONÇA, Usuário Externo**, em 05/04/2022, às 15:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2764656** e o código CRC **627BEFAE**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades, bênçãos e pessoas colocadas em nosso caminho. Por todo ânimo, toda luz e energia para realizar nossos sonhos.

Agradecemos aos nossos pais, Ireliuma Pereira Silva Paiva e Paulo Souza de Paiva, por todo apoio durante os anos que se passaram, por toda paciência e amor. Agradecemos cada luta, cada noite sem dormir e cada oração. Obrigado pela preocupação com nossa formação e por acreditarem que o conhecimento transforma a vida das pessoas.

À nossa irmã, Ana Flávia Silva Paiva, que participou de boa parte de nossa formação, que compartilhou as alegrias, preocupações e descontentamentos. Nossa companheira de barriga, de casa e de idas para a faculdade.

Aos nossos familiares e amigos, por todo apoio e orações. Em especial, aos amigos da Turma 100 da Faculdade de Farmácia, vocês foram essenciais e ótimas companhias durante estes anos.

Ao Danilo Fernandes Alves e Amanda Cecília Guimarães Borges, nosso agradecimento especial pela paciência e companheirismo durante esse período. Vocês são muito importantes em nossas vidas.

A Universidade Federal de Goiás, pela oportunidade da graduação e conhecimentos adquiridos, aos docentes do curso de Farmácia que nos apoiaram nessa caminhada, ao nosso orientador Professor Dr. Bruno Júnior Neves, agradecemos por todo apoio e competência ao nos conduzir com êxito na elaboração deste trabalho. Muito obrigado por todo conhecimento compartilhado.

Agradecemos a todos os professores do curso de Farmácia por colaborarem para nossa formação acadêmica, com certeza a caminhada foi mais fácil com a ajuda de todos vocês.

RESUMO

As N-nitrosaminas são impurezas que apresentam grupamento químico N-nitroso alifático em sua estrutura química $R_2N-N=O$. Essas impurezas formam-se a partir de reações de aminas, amidas ou aminoderivados com agentes nitrosantes. Diante do risco de carcinogenicidade por exposição a longo prazo promovido por esse tipo de impureza, é imprescindível que se haja o controle de formação dessas impurezas em todas as etapas do processo de fabricação de medicamentos. Conseqüentemente, nos últimos anos agências regulatórias no mundo todo, tais como a ANVISA e FDA, têm estabelecido protocolos para avaliação de risco de N-nitrosaminas, com o intuito de determinar a possibilidade de formação de N-nitrosaminas no processo de síntese do Insumo Farmacêutico Ativo, observando fatores como a combinação de reagentes, solventes, e materiais de partida utilizados, os intermediários formados, as possíveis impurezas e produtos de degradação. Outras etapas envolvidas na avaliação de risco estão associadas ao processo fabricação do produto acabado, compatibilidade com excipientes, armazenamento ao longo de todo seu curso útil e possível degradação ou interação com excipientes e material de embalagem. Diante desse contexto, o presente manuscrito apresenta uma revisão da literatura para (1) avaliação de risco; (2) testes confirmatórios; e (3) alterações pós-registro associadas a formação de N-nitrosaminas em medicamentos. Em paralelo, também foram estabelecidos critérios para avaliação toxicológica de N-nitrosaminas com potencial mutagênico desconhecido.

Palavras-chave: impurezas, N-nitrosaminas, carcinogenicidade, medicamentos, avaliação de risco, alterações pós-registro.

ABSTRACT

N-nitrosamines are impurities that have an aliphatic N-nitroso chemical group of chemical structure $R_2N-N=O$. These impurities are formed from the reaction of amines, amides or amino derivatives with nitrosating agents. In face of carcinogenicity risk due to long-term exposure promoted by this type of impurity, it is essential to control the formation of these impurities at all stages of the drug manufacturing process. Consequently, regulatory agencies around the world, such as ANVISA and FDA, have established protocols for risk assessment of N-nitrosamines, in order to determine the possibility of formation of N-nitrosamines in the API synthesis process, observing factors such as the combination of reagents, solvents, and starting materials used, the intermediates formed, the possible impurities and degradation products. Other steps involved in risk assessment are associated with the manufacturing process of the finished product, compatibility with excipients, storage throughout its useful life and possible degradation or interaction with excipients and packaging material. In this context, the present manuscript presents a systematic review for (1) risk assessment; (2) confirmatory tests; and (3) post-registration changes associated with the formation of N-nitrosamines in medications. In parallel, criteria for toxicological evaluation of N-nitrosamines with unknown mutagenic potential were also established.

Keywords: impurities, N-nitrosamines, carcinogenicity, drugs, risk assessment, post-registration changes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura geral de N-nitrosaminas.....	15
Figura 2. Linha do tempo de investigação do potencial toxicológico de N-nitrosaminas	16
Figura 3. Cristais de oxalato de ranitidina (a) e cloridrato de ranitidina (b) (número de depósito no Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC): 1109775).....	19
Figura 4. Mecanismo reacional (a) e equação geral (b) de formação de N-nitrosaminas	21
Figura 5. (a) Hidrólise da DMF para formação de NDMA e (b) hidrólise de NMP e formação de NMBA (Fonte: ANVISA, 2021)	22
Figura 6. Formação do íon nitrosônio (a) e nitrosação de aminas (b) a partir do nitrito de sódio em meio ácido (Fonte: ANVISA, 2021)	24
Figura 7. Formação endógena.	25
Figura 8. Mecanismo reacional de decomposição de N-nitrosaminas em pH ácido (Fonte: RODRIGUES et. al., 2018).....	25
Figura 9. Mecanismo de (a) metabolização e (b) hidrólise de N-nitrosaminas (Adaptado de: RODRIGUES, R. L. B. et. al., 2018).....	26
Figura 10. Modo de ação de N-nitrosaminas.....	26
Figura 11. Etapas associadas ao risco de formação de nitrosaminas em insumo farmacêutico ativo (IFA) e no produto acabado (PA).....	27
Figura 12. Fármacos propensos à formação de nitrosaminas	28
Figura 13. Etapas para a avaliação de risco e ações decorrentes da presença de nitrosaminas (Fonte: ANVISA, 2021 adaptado).....	29
Figura 14. Fluxograma para avaliação toxicológica de impurezas com potencial mutagênico desconhecido.	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Limites de notificação, identificação e qualificação estabelecidos pela RDC nº 53/2015 (Fonte: ANVISA, 2015.)	14
Quadro 2. Principais N-nitrosaminas identificadas em medicamentos (Adaptado de: ANVISA, 2021)	18
Quadro 3. Exemplos de combinações críticas que podem levar a formação das nitrosaminas (ANVISA, 2021)	23
Quadro 4. Sistema de classificação de impureza em relação ao potencial mutagênico/carcinogênico e ações de controle (Fonte: ICH, 2017).....	31

LISTA DE SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATD – Administração Total Diária
BPF – Boas Práticas de Fabricação
CHMP – Comitê de Produtos para Uso Humano (Committee for Medicinal products for Human Use)
DMA – Dimetilamina
DMF – Dimetilformamida
DMN – Dimetilnitrosamina
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
EMA – European Medicine Agency
EUA – Estados Unidos da América
FDA – Food and Drug Administration
ICH – International Conference on Harmonization
IFA – Insumo farmacêutico ativo
MNP – 1-nitroso-4-metilpiperazina
NDEA – Nitrosodietilamina
NDELA – N-nitrosodietanolamina
NDIPA – N-nitrosodiisopropilamina
NDMA – N-nitrosodimetilamina
NEIPA – N-nitrosoetilisopropilamina
NMB – N-nitroso-N-metil-4-aminobutirico
NMBA – Carboxipropilmetilnitrosamina
NMP – Metilpirrolidona
NPIP – Nitrosopiperidina
NPIR – Nitrosopirrolidina
OECD – Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
QSAR – Quantitative Structure-Activity/Toxicity Relationship
RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. N-nitrosaminas	15
2.1. Aspectos históricos	15
2.2. Condições químicas e físicas para formação de N-nitrosaminas.....	21
2.3. Modo de ação de N-nitrosaminas.....	26
2.4. Etapas associadas ao risco de formação de nitrosaminas.....	27
2.5. Avaliação do risco toxicológico de N-nitrosaminas conhecidas	28
2.5.1. Avaliação do risco toxicológico de novas N-nitrosaminas.....	31
3. Conclusão	34
REFERÊNCIAS.....	35

1. Introdução

Impurezas são qualquer componente não desejável presente no Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) ou no produto acabado que não seja o IFA ou os excipientes da formulação. Enquanto produtos de degradação são conceituados como impurezas que podem ser formadas durante a fabricação ou o armazenamento dos medicamentos (ANVISA, 2015). A avaliação e classificação de toxicidade de impurezas em produtos farmacêuticos é baseada em critérios internacionais bem estabelecidos (ICH, 2014). Atualmente o *Food and Drug Administration* (FDA), *European Medicine Agency* (EMA) e *International Conference on Harmonisation* (ICH) disponibilizam guias para orientação sobre avaliação de toxicidade de impurezas. A ICH possui cinco guias que orientam algumas questões relativas às impurezas:

- Q1A – Testes de estabilidade em fármacos e produtos novos (ICH, 2003);
- Q3A – Impurezas em fármacos novos (ICH, 2006);
- Q3B – Impurezas em produtos novos (ICH, 2006);
- Q3C – Impurezas: solventes residuais (ICH, 2021);
- Q6A – Especificações: procedimentos e critérios de aceitação para fármacos e produtos novos; substâncias químicas.

A elaboração dos guias do ICH Q3A (2006), Q3B (2006) e Q3C (2021) representou um consenso de como as impurezas devem ser controladas nos produtos comercializados. Contudo, várias questões não são discutidas, como por exemplo, níveis aceitáveis de impurezas durante o desenvolvimento e o controle de impurezas genotóxicas. Neste sentido, o guia ICH M7 foi desenvolvido para definir os critérios para o estabelecimento de níveis de impurezas mutagênicas ou produtos de degradação que resultem em um risco aceitável (ICH, 2017).

No Brasil, a RDC nº 53 de 4 de dezembro de 2015 estabelece parâmetros para a verificação de impurezas (produtos de degradação) em medicamentos, para elaboração do perfil de degradação correspondente e para a avaliação do perfil toxicológico dos produtos de degradação formados ao longo do prazo de validade de medicamentos classificados como novos, genéricos e similares. Nesse contexto, estudos de degradação forçada são explorados para verificar a formação de impurezas através da exposição do IFA e produto acabado a condições de estresse, como por exemplo, luz, temperatura, calor, umidade, hidrólise ácida/ básica e oxidação (ANVISA, 2015). Essa análise permite o desenvolvimento de métodos indicativos para estabelecer:

- Limite de identificação: valor acima do qual um produto de degradação deverá ter sua estrutura química identificada;
- Limite de notificação: valor acima do qual um produto de degradação deverá ser reportado no estudo de estabilidade;
- Limite de qualificação: valor acima do qual um produto de degradação deverá ter segurança biológica especificada.

A necessidade de notificação, identificação e qualificação dos produtos de degradação no decorrer do estudo de estabilidade do medicamento deve ser avaliada com base nos limites estabelecidos no Quadro 1.

Quadro 1. Limites de notificação, identificação e qualificação estabelecidos pela RDC nº 53/2015 (Fonte: ANVISA, 2015.).

	Dose máxima diária ^a	Limite ^b
Limite de notificação	≤1 g	0,1%
	>1 g	0,05%
Limite de identificação	<1 mg	1%
	1 – 10 mg	0,5%
	>10 mg – 2 g	0,2%
Limite de qualificação	>2 g	0,1%
	<10 mg	1,0% ou 50 µg ATD, o que for menor
	10 – 100 mg	0,5% ou 200 µg ATD, o que for menor
	>100 mg – 2 g	0,2% ou 3mg ATD, o que for menor
	>2 g	0,15%

^aQuantidade máxima do insumo farmacêutico ativo administrado por dia; ^bLimites dos produtos de degradação são expressos como a percentagem do insumo farmacêutico ativo ou como a administração total diária (ATD) de um produto de degradação; ATD: administração total diária.

Caso o produto de degradação identificado não apresente toxicidade relevante, o fabricante deverá apresentar justificativa técnica correlacionando o teor de ativo obtido ao final do estudo de estabilidade e a eficácia do medicamento, de modo que o teor de IFA ao final do estudo de estabilidade ainda seja elevado o suficiente para manter a eficácia do medicamento. Por outro lado, se não houver nenhum dado de literatura sobre a degradação do IFA e nos casos em que os dados da literatura indicarem que os

produtos de degradação são tóxicos, o fabricante deverá qualificar o(s) produto(s) de degradação, estabelecer os limites aceitáveis. Nos casos em que nenhum dado de literatura estiver disponível, o fabricante deverá identificar e qualificar o(s) produto(s) de degradação (ANVISA, 2017).

Diante desse contexto, o objetivo do trabalho foi fazer uma revisão da literatura para (1) avaliação de risco; (2) testes confirmatórios; e (3) alterações pós-registro associadas a formação de N-nitrosaminas em medicamentos. Em paralelo, também foram estabelecidos critérios para avaliação toxicológica de N-nitrosaminas com potencial mutagênico desconhecido.

2. N-nitrosaminas

As N-nitrosaminas são impurezas carcinogênicas que apresentam grupo N-nitroso alifático em sua estrutura química $R_2N-N=O$ (Figura 1), que podem estar presentes numa grande variedade de produtos como alimentos (e.g., bacon, presunto defumado, salsicha, salame, carne de porco frita, linguiça defumada), bebidas, agrotóxicos, produtos de borracha, cosméticos e medicamentos (IKEDA & MIGLIORESE, 1990; ANVISA, 2021; DUTRA et. al., 2007). De acordo com o guia ICH M7, as N-nitrosaminas podem apresentar acentuado potencial carcinogênico, ou seja, capacidade de danificar o genoma ou à interrupção dos processos metabólicos celulares, e conseqüentemente, promover a formação de câncer (ICH, 2017).



Figura 1. Estrutura geral de N-nitrosaminas

2.1. Aspectos históricos

Os primeiros estudos de investigação do potencial toxicológico de N-nitrosaminas datam da década de 1950. A linha do tempo de investigação do potencial toxicológico de N-nitrosaminas está disponível na Figura 3. Em 1956, Magee e Barnes demonstraram que a exposição prolongada a N-nitrosaminas seria a principal causa do desenvolvimento dos tumores. Nesse estudo, o potencial carcinogênico de dimetilnitrosamina (DMN) foi comparado com o de outros compostos, como

tetracloro de carbono e tioacetamida. Conseqüentemente, Magee e Barnes demonstraram que a impureza DMN era capaz de causar uma quantidade muito maior de necrose e hemorragia hepática em ratos, do que os outros compostos, além de levar ao desenvolvimento de tumores hepáticos (MAGEE & BARNES, 1956).

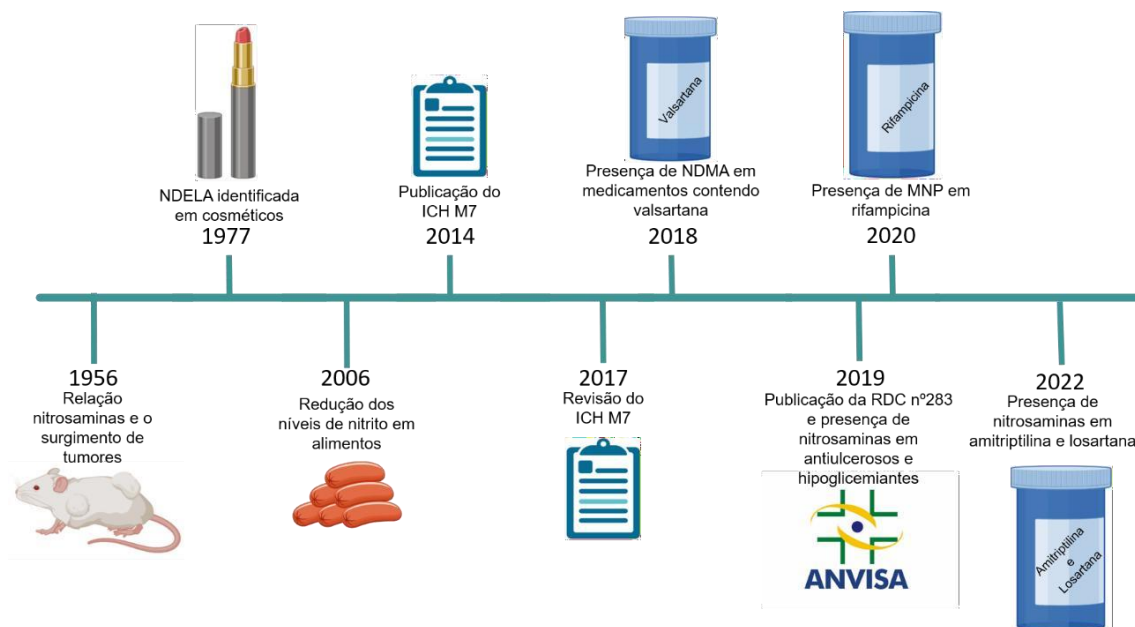


Figura 2. Linha do tempo de investigação do potencial toxicológico de N-nitrosaminas.

Em 1977, a impureza N-nitrosodietanolamina (NDELA) foi identificada pela primeira vez em cosméticos. Nesse contexto, emulsificantes como dietanolamina e trietanolamina, que são frequentemente utilizados como matérias primas na fabricação de cosméticos, podem ser precursores na formação de nitrosaminas quando combinados com agentes nitrosantes tais como os conservantes 2-bromo-2-nitro-1,3 propanodiol e o 5-bromo-5-nitro-1,3 dioxano (RATH & CANAES, 2009). Embora o risco seja menor, N-nitrosaminas como o NDELA podem atingir a circulação sistêmica, através da absorção por via oral ou permeação de pele. A NDELA pode se acumular em órgãos como fígado e a bexiga, levando a efeitos tóxicos prolongados (FAN et. al., 1977).

Além dos cosméticos, outra importante fonte de exposição é por meio da alimentação, devido à presença do íon nitrito, principalmente nos alimentos processados, carnes defumadas, chocolates, cereais, óleos vegetais e bebidas alcoólicas (CANAES & RATH, 2011; DUTRA; RATH; REYES, 2007). Os vegetais também podem sofrer contaminações por N-nitrosaminas. Nesse caso, a impureza pode entrar em contato com o vegetal no meio de cultivo ou durante a armazenagem. No cultivo a contaminação pode acontecer por causa de praguicidas e herbicidas contaminados,

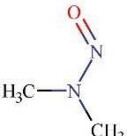
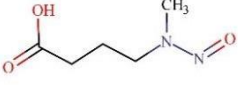
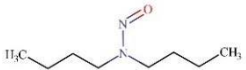
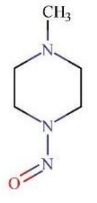
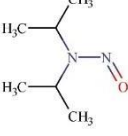
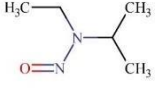
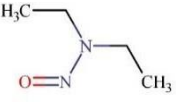
também alguns microrganismos no solo são capazes de formar nitrosaminas (CHU; LI, 1993).

Diante do cenário de risco carcinogênico de N-nitrosaminas em alimentos, em 2006 o nível de nitrito residual permissível em alimentos foi reduzido para 0,015g/100g ou 150mg/kg (MAPA, 2006), uma vez que esses agentes nitrosantes, utilizados principalmente na conservação de carnes defumadas e salsichas, pode levar a formação das nitrosaminas como nitrosodietilamina (NDEA), nitrosopiperidina (NPIP) e nitrosopirrolidina (NPIR) (ROSTELATO-FERREIRA et. al. 2017; DUTRA et. al., 2007).

Em 2014, foi publicado pela primeira vez o guia ICH M7 e desde então é utilizado como referência para orientar o controle de impurezas mutagênicas, principalmente nos processos de registro e pós-registro de IFAs e medicamentos. Em 2017, este guia foi revisto para contemplar um adendo com monografias de impurezas mutagênicas conhecidas e comumente encontradas durante a síntese de fármacos (ICH, 2017).

Em 2018, medicamentos contendo o fármaco valsartana (antagonistas de receptor de angiotensina II) despertaram atenção de agências regulatórias como a ANVISA por causa da presença de N-nitrosodimetilamina (NDMA) (ANVISA, 2019). Posteriormente, outras N-nitrosaminas como N-nitrosodietilamina (NDEA), N-nitrosodiisopropilamina (NDIPA), N-nitrosoetilisopropilamina (NEIPA) e ácido N-nitroso-N-metil-4-aminobutírico (NMB), foram detectadas em outros medicamentos contendo candesartana, irbesartana, losartana e olmesartana (WHO, 2019). As estruturas químicas de algumas nitrosaminas detectadas em medicamentos podem ser visualizadas no Quadro 2.

Quadro 2. Principais N-nitrosaminas identificadas em medicamentos (Adaptado de: ANVISA, 2021).

Estrutura química	N-nitrosamina	Sigla	CAS	Ingestão aceitável (ng/dia)
	dimetilnitrosamina	NDMA	62-75-9	96,0
	carboxipropilmetilnitrosamina	NMBA	61445-55-4	96,0
	dibutilnitrosamina	NDBA	924-16-3	26,5
	metilnitrosopiperazina	MeNP	16339-07-4	26,5
	di-isopropilnitrosamina	DIPNA	601-77-4	26,5
	etilisopropilnitrosamina	EIPNA	16339-04-1	26,5
	dietilnitrosamina	NDEA	55-18-5	26,5

Diante do risco de formação de N-nitrosaminas em medicamentos, em 17 de maio de 2019 foi publicada a RDC nº 283, que trata sobre a investigação, controle e eliminação de N-nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em medicamentos contendo IFAs antagonistas do receptor de Angiotensina II (AT1) (ANVISA, 2019). A presença de N-nitrosaminas em medicamentos contendo sartanas está associada ao anel tetrazólico presente na estrutura química de parte dos fármacos desta classe, uma vez que a sua síntese utiliza nitrito de sódio e solventes aminícos (ou contendo traços de

aminas), promovendo assim condições favoráveis a nitrosação e formação da impureza NDMA (WHO, 2019).

Após o ocorrido, as agências reforçaram a pesquisa pelas impurezas em outras classes de medicamentos. Em 2019 foi relatado a presença de N-nitrosaminas em medicamentos antiulcerosos (nizatidina e ranitidina) hipoglicemiantes (metformina) (CMS, 2021). No mesmo ano, a formação desses contaminantes foi associada a materiais de embalagem primária contendo nitrocelulose (ANVISA, 2021). Diante desse contexto, em 1º de Abril de 2020, a agência FDA determinou que todos os medicamentos contendo ranitidina fossem retirados dos mercados dos EUA e o Comitê de medicamentos para uso humano da EMA (CHMP, do inglês *Committee for Medicinal Products for Human Use*) recomendou a suspensão de todos os medicamentos contendo ranitidina na União Europeia, mesmo que em baixos níveis (FDA, 2021; EMA, 2020).

Estudos de estabilidade acelerada conduzidos pela FDA demonstraram que níveis elevados de NDMA em medicamentos à base de ranitidina podem ser detectados após duas semanas e que aumentam com o passar do tempo de armazenamento. Essa degradação pode ser acelerada caso o medicamento for armazenado em temperaturas superiores a temperatura ambiente. (FDA 2020; King et al. 2020). Entretanto, a formação desta impureza carcinogênica está relacionada ao arranjo cristalográfico da molécula nos IFAs comerciais. A figura 4 apresenta dois tipos de cristais obtidos a partir de oxalato de ranitidina (a) (KOJIC-PRODIC, B. et. al., 1982) e cloridrato de ranitidina (b) (MIRMEHRABI, M. et. al., 2004).

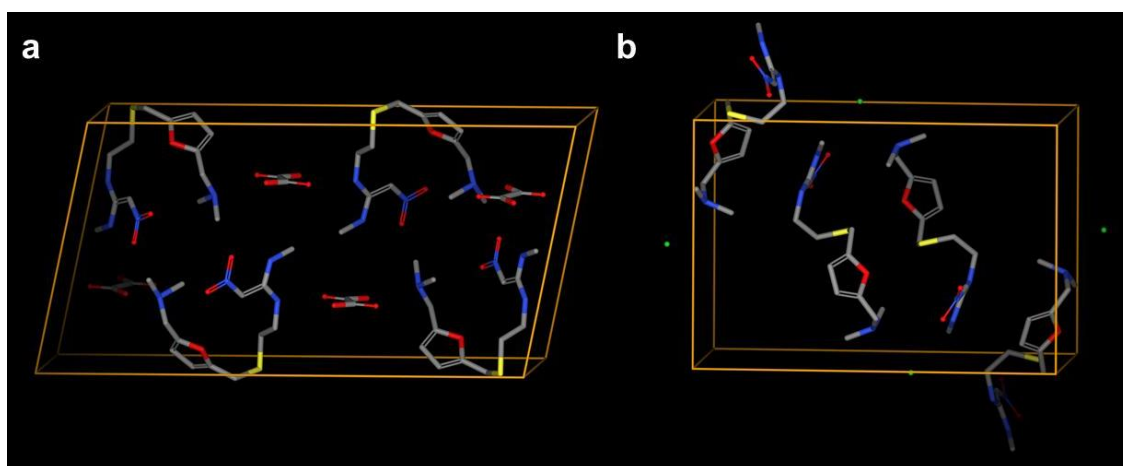


Figura 3. Cristais de oxalato de ranitidina (a) e cloridrato de ranitidina (b) (número de depósito no Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC): 1109775).

Note que na Figura 4a, os grupamentos nitro e amina terciária estão coordenados (ligeiramente próximos), favorecendo desta forma a nitrosação intramolecular para formação de NDMA. Nesse caso, a molécula sofre uma degradação ao longo do tempo de armazenamento do produto. Já na Figura 4b, a molécula de ranitidina adquiriu arranjo conformacional diferente, embora os grupamentos nitro e amina terciária estejam em regiões próximas, provavelmente devido a interações intermoleculares com o sal inorgânico. Conseqüentemente, considerações a respeito do polimorfismo de IFAs devem ser levadas em consideração para formação de N-nitrosaminas.

Em outubro de 2020, a impureza 1-nitroso-4-metilpiperazina (MNP) foi identificada em lotes de rifampicina, um fármaco utilizado para o tratamento de tuberculose e outras doenças infecciosas. No entanto, a EMA orientou que os riscos associados a interrupção do tratamento com o medicamento superavam os riscos a exposição a MNP (EMA, 2021).

Em 2022, a agência Health Canada orientou a retirada de lotes de medicamentos contendo o IFA amitriptilina do seu mercado nacional por conter NDMA acima de limites aceitáveis (GOVERNMENT OF CANADÁ, 2022). Também em 2022, lotes de medicamentos contendo losartana potássica da empresa Sanofi Medley Farmacêutica foram retirados do mercado por conter as impurezas mutagênicas (SANOFI, 2022).

Diante desse cenário histórico, a FDA orienta que os fabricantes tomem as medidas necessárias para a quantificação, redução ou remoção dessas impurezas acima no limite permitido (CMS, 2021). A EMA, em 2019, publicou um novo capítulo no documento de perguntas e respostas, *Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products*, descrevendo as causas identificadas, até o momento, para a contaminação por nitrosaminas, visando auxiliar os fabricantes para que desenvolvam estratégias de controle (VITA RELATORY AFFAIRS CONSULTING, 2019).

Assim como as outras agências reguladoras internacionais, em 2021, a ANVISA emitiu o parecer nº5/2021/SEI/GIMED/GGFIS/DIRE4/ANVISA que avalia a proposta de RDC sobre a avaliação do risco e controle de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em medicamentos de uso humano, com objetivos como a avaliação do risco de presença de nitrosaminas em todos os medicamentos do mercado brasileiro, desenvolvimento de métodos analíticos

sensíveis e seletivos para a pesquisa de nitrosaminas, dentre outros (ANVISA, 2021).

2.2. Condições químicas e físicas para formação de N-nitrosaminas

As N-nitrosaminas formam-se a partir de reações de aminas, amidas ou aminoderivados com agentes nitrosantes (Figura 5), que são compostos que apresentam grupos NO_x em sua estrutura, sendo os mais importantes: trióxido de dinitrogênio (N₂O₃), tetróxido de dinitrogênio (NO₂/N₂O₄), ácido nitroso protonado H₂ONO⁺ e óxido nítrico (NO) (FRATUCCI et. al., 2017). Outros compostos como haletos de nitrosila (NOCl), nitrosiltiocianato e nitrosofenol, também são capazes de nitrosar aminas (EMA 2020).

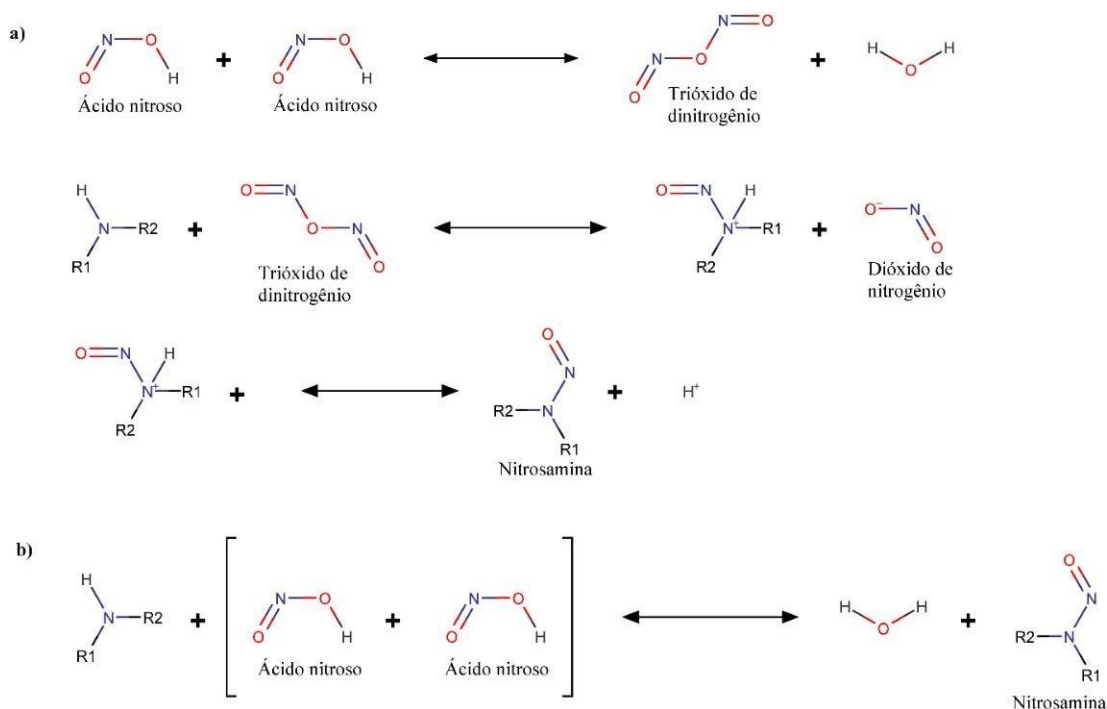


Figura 4. Mecanismo reacional (a) e equação geral (b) de formação de N-nitrosaminas

A nitrosação ocorre com maior frequência em fármacos contendo aminas secundárias, terciárias e compostos de amônio quaternário. Por outro lado, a exposição de fármacos contendo aminas primárias a agentes nitrosantes leva a formação de alquildiazoidróxido (ácido diazótico) por interconversão tautomérica. Esse ácido por sua vez é propício a desidratação na presença de íons hidrogênio e formação de íon diazônio, que é rapidamente decomposto em carbocátion, liberando nitrogênio (N₂), e consequentemente não formando N-nitrosaminas (ANVISA, 2021). Outras condições

não clássicas para formação de N-nitrosaminas são oxidação de hidrazinas e formação a partir de compostos organometálicos (ANVISA, 2021; EMA, 2020; EMA, 2021).

Nesse sentido, fatores como o pH do meio, presença de catalisadores ou inibidores, estrutura e pKa das aminas suscetíveis a nitrosação, bem como quantidade de precursores ou agentes nitrosantes, são fundamentais para a formação das N-nitrosaminas. Por outro lado, agentes estabilizantes frequentemente incorporados em formulações cosméticas (e.g., ácido ascórbico, butil-hidroxitolueno, ácido sulfâmico, sulfamato de amônio, ácido tânico, α -tocoferol) podem funcionar como inibidores da nitrosação, reduzindo o agente nitrosante. Conseqüentemente, esses agentes podem reduzir/eliminar o risco da ocorrência de N-nitrosaminas, conferindo maior estabilidade química a formulação (SHENOY & CHOUGHULEY, 1989; RATH & CANAES, 2009).

Eventualmente, essas impurezas podem ser formadas durante o processo de síntese de IFAs, podendo ser originadas de contaminações com aminas secundárias e terciárias dos materiais de partida, solventes e reagentes utilizados nesta síntese. Um exemplo disso, é a formação de NDMA a partir da nitrosação do produto de hidrólise dimetilamina (DMA) do solvente dimetilformamida (DMF) (Figura 6a).

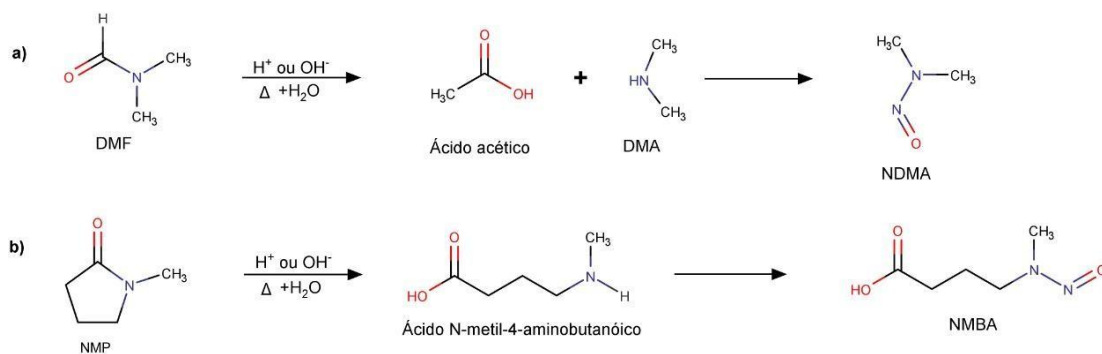
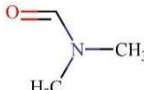

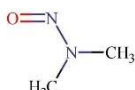
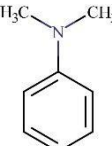
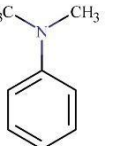
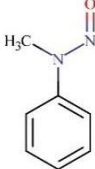
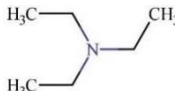
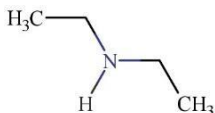
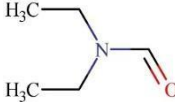
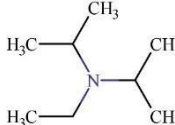
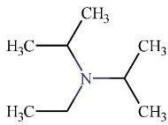
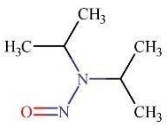
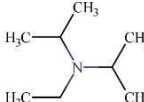
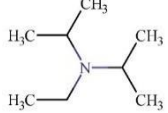
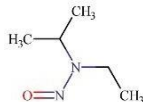


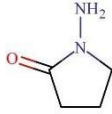
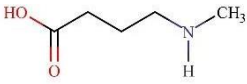

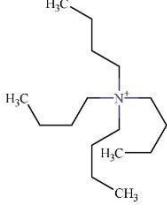
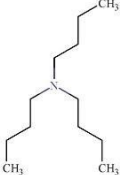
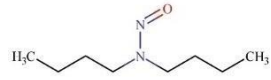
Figura 5. (a) Hidrólise da DMF para formação de NDMA e (b) hidrólise de NMP e formação de NMBA (Fonte: ANVISA, 2021).

Outro solvente que pode sofrer hidrólise e gerar um elemento suscetível a nitrosação é o metilpirrolidona (NMP), que ao formar o ácido N-metil-4-aminobutanóico, pode reagir com um agente nitrosante e formar a carboxipropilmetilnitrosamina (NMBA) (Figura 6b) (Klein, 2017; EMA, 2020). Dadas essas características, a possibilidade de presença ou contaminação simultânea de aminas e agentes nitrosantes, as condições de síntese dos IFAs (temperatura e pH) devem ser controladas, de modo que se evite combinações críticas que possam levar a formação de

N-nitrosaminas (ANVISA, 2021). Outros exemplos de combinações críticas para formação de N-nitrosaminas durante processos de síntese de IFAs estão elencados no Quadro 3.

Quadro 3. Exemplos de combinações críticas que podem levar a formação das nitrosaminas (ANVISA, 2021).

Fonte da amina	Fonte de NO _x	Amina Nitrosada	Nitrosamina formada
 <p>N,N-dimetilformamida</p>	NaNO ₂	 <p>dimetilamida</p>	 <p>dimetil(nitroso)amina</p>
 <p>N,N-dimetilanilina</p>	NaNO ₂	 <p>N,N-dimetilanilina</p>	 <p>N-metil-N-nitrosoanilina</p>
 <p>trietilamina</p>	NaNO ₂	 <p>dietilamina</p>	 <p>etenildietilamina</p>
 <p>etilbis(propan-2-il)amina</p>	NaNO ₂	 <p>etilbis(propan-2-il)amina</p>	 <p>nitrosobis(propan-2-il)amina</p>
 <p>etilbis(propan-2-il)amina</p>	NaNO ₂	 <p>etilbis(propan-2-il)amina</p>	 <p>etil(nitroso)(propan-2-il)amina</p>

 <p>1-aminopirrolidin-2-ona</p>	<p>NaNO₂</p>	 <p>Ácido 4-(metilamino)butanóico</p>	 <p>Ácido 4-(N-metilformamido)butanóico</p>
 <p>tetrabutilamina</p>	<p>NaNO₂</p>	 <p>tributilamina</p>	 <p>dibutil(nitroso)amina</p>

A formação destas impurezas também pode acontecer de forma endógena, a partir de agentes nitrosantes internos do próprio organismo, sendo que essa formação ocorre por causa da ingestão de precursores da reação (e.g., nitratos e nitritos). Eventualmente, os nitritos podem ser protonados em meio ácido (e.g., suco gástrico, Figura 7), levando à formação do ácido nitroso, que dimeriza originando o trióxido de dinitrogênio (N₂O₃), que por sua vez reage com aminas levando à formação de N-nitrosaminas (LOEPPKY, 2009; PREUSSMAN, 1984). No estômago, alguns ácidos (e.g., ácido ascórbico, ácido tânico, ácido sulfâmico) competem com as aminas pelo grupo nitrosante, antagonizando a produção de nitrosaminas (IN SILICALL, 2021).

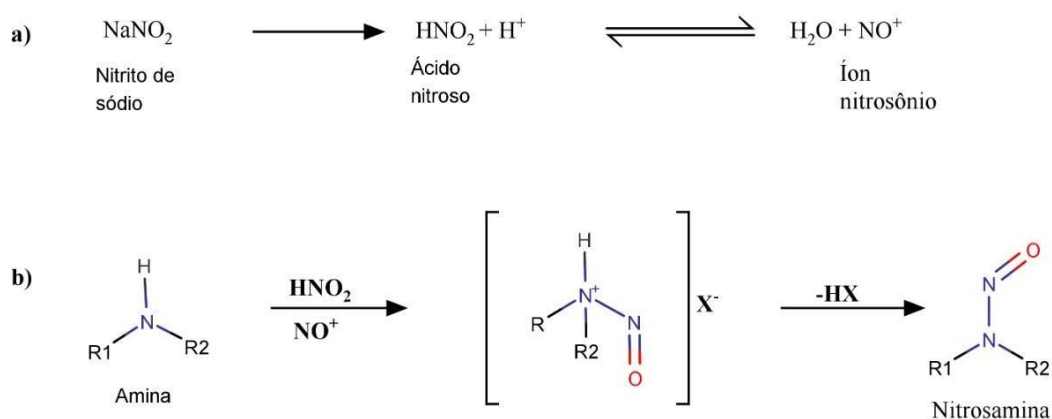


Figura 6. Formação do íon nitrosônio (a) e nitrosação de aminas (b) a partir do nitrito de sódio em meio ácido (Fonte: ANVISA, 2021).

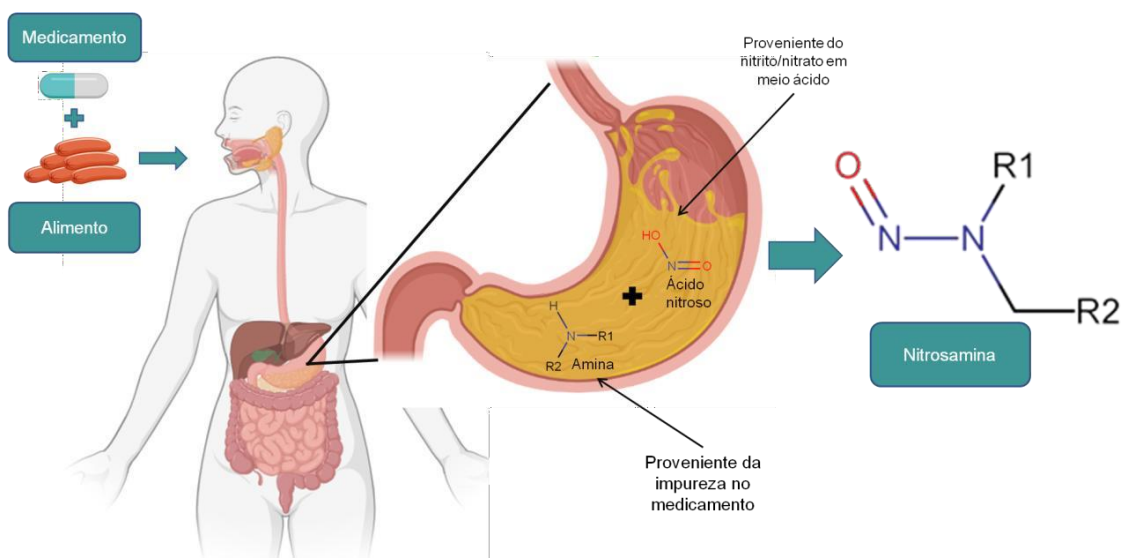


Figura 7. Formação endógena.

Por outro lado, as N-nitrosaminas são difíceis de decompor em pH neutro ou fortemente alcalino, pois elas são estruturalmente mais estáveis nesses meios. Já em pH ácido, a molécula de nitrosamina sofre um rearranjo para formação de diazo hidróxido que libera uma molécula de água para formar o cátion diazônio. O cátion diazônio formado se decompõe em nitrogênio e carbocátion (RODRIGUES et. al., 2018). As nitrosaminas também podem ser decompostas lentamente há aldeídos, nitrogênio e óxido nítrico, ou amins e ácido nitroso, quando expostas à radiação ultravioleta (IKEDA & MIGLIORESE, 1990; RATH & CANAES, 2009).

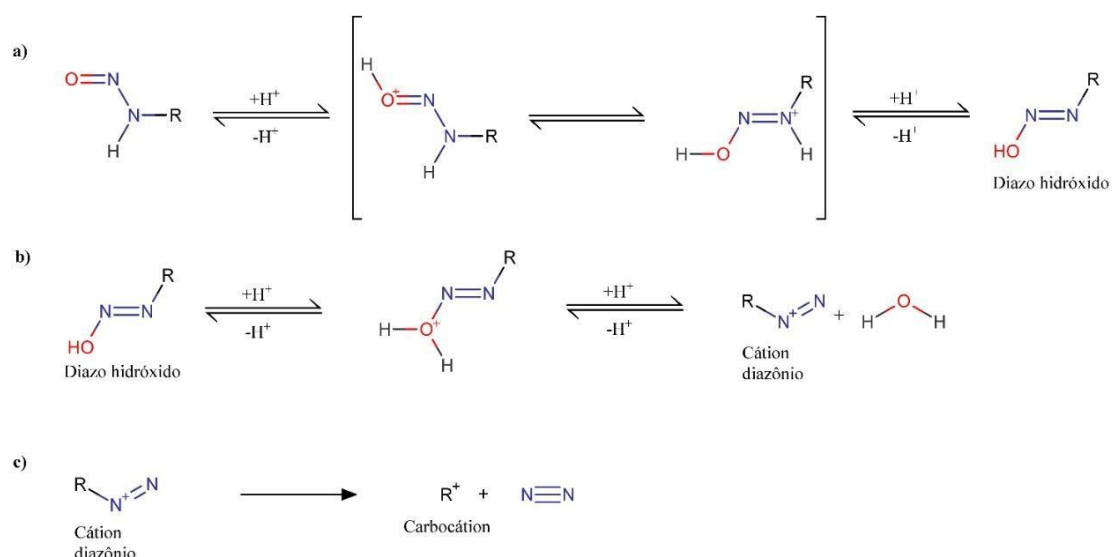


Figura 8. Mecanismo reacional de decomposição de N-nitrosaminas em pH ácido (Fonte: RODRIGUES et. al., 2018).

2.3. Modo de ação de N-nitrosaminas

As N-nitrosaminas podem ser metabolizadas/biotransformadas por enzimas do citocromo P450, através de reações de hidroxilação (Fase I, Figura 2a) com o carbono α do grupo alquila adjacente ao grupo N-nitroso, levando a formação de N-hidroxilamina e posteriormente íon diazônio (eletrófilo).

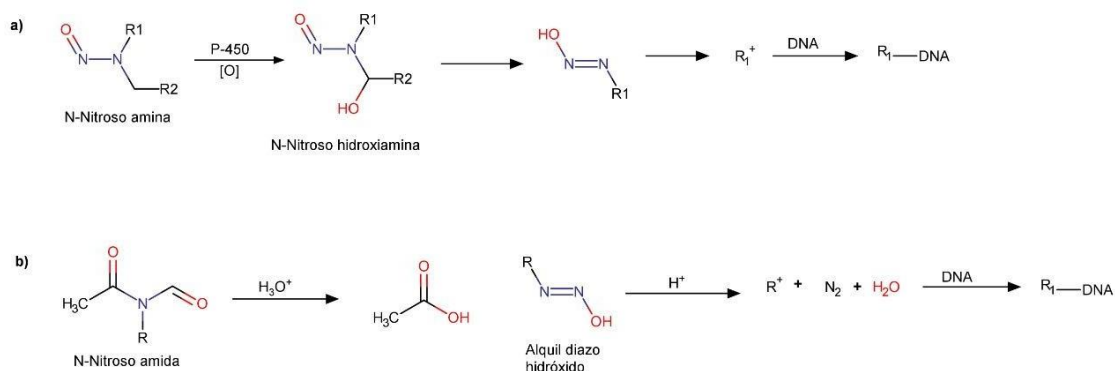


Figura 9. Mecanismo de (a) metabolização e (b) hidrólise de N-nitrosaminas (Adaptado de: RODRIGUES, R. L. B. et. al., 2018).

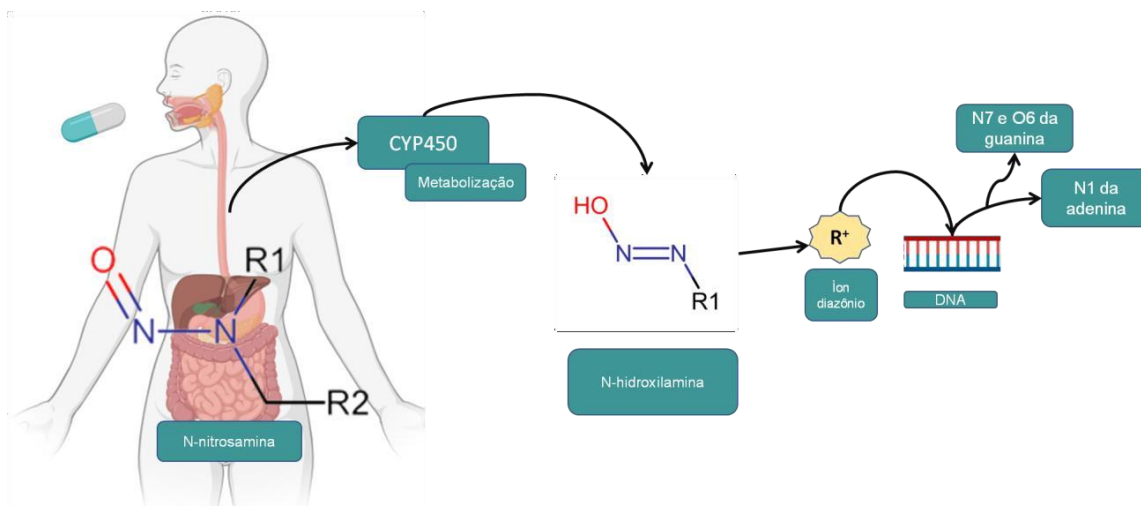


Figura 10. Modo de ação de N-nitrosaminas.

Em condições ácidas, tais como a do suco gástrico, estas impurezas também podem hidrolisar (Figura 2b), levando a formação de diazo-alcanos. Estes eletrófilos são capazes promover mutações catalisando alterações de sítios específicos da dupla hélice do DNA, ou alquilando bases nitrogenadas nas posições N7 e O6 da guanina e N1 da adenina (MIRVISH, 1975; RODRIGUES, R. L. B. et. al., 2018). Caso esses adutos de

DNA formados não sejam separados, pode-se ter mutação e conseqüentemente desenvolvimento de tumores (CARLSON, E. S. et al., 2017). Os danos gerados podem levar ao surgimento de tumores em diferentes órgãos dependendo da via de administração, dose e espécie animal (RATH & CANAES, 2009).

2.4. Etapas associadas ao risco de formação de nitrosaminas

Embora as N-nitrosaminas tenham sido detectadas em apenas alguns medicamentos, é imprescindível que se haja o controle de formação dessas impurezas em todas as etapas do processo de fabricação de medicamentos (FDA, 2021). Essa avaliação do risco baseia-se no Dossiê do Insumo Farmacêutico Ativo (DMF, *Drug Master File*), bem como a formulação em si, os excipientes utilizados, o material de embalagem a ser adotado e as Boas Práticas de Fabricação (BPF) empregadas no processo.

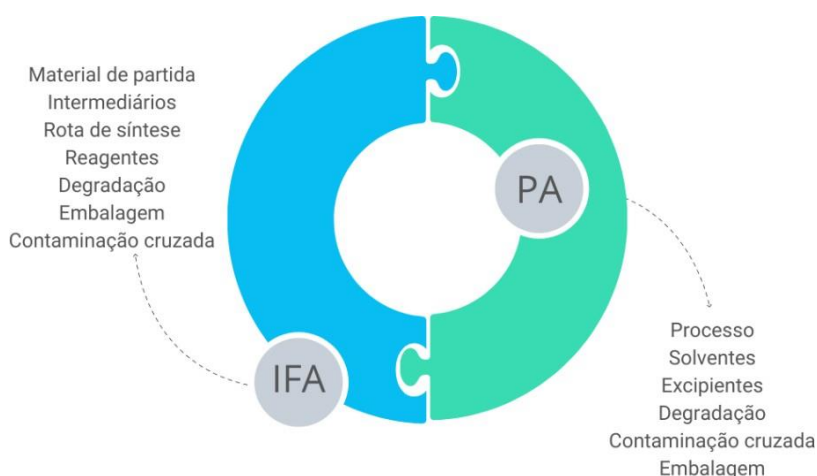


Figura 2. Etapas associadas ao risco de formação de nitrosaminas em insumo farmacêutico ativo (IFA) e no produto acabado (PA).

As N-nitrosaminas podem ser formadas a partir de reações de hidrólise ácida ou básica com excipientes da formulação (e.g., glicolato de amido sódico, croscarmelose sódica, povidona, crospovidona, lactose) (ANVISA, 2021; EMA, 2020; EMA, 2021). Além disso, essas impurezas podem ser provenientes do contato do fármaco ou dos excipientes com outros compostos presentes no produto acabado, como é o caso da nitrocelulose presente no material que embalagem primária que pode reagir com aminas oriundas de excipientes ou da própria molécula do fármaco, como pode ser visualizado na figura 12, onde algumas moléculas de princípios ativos foram apresentadas destacando sua estrutura relacionada a formação de nitrosaminas (ICH, 2017; ANVISA, 2021).

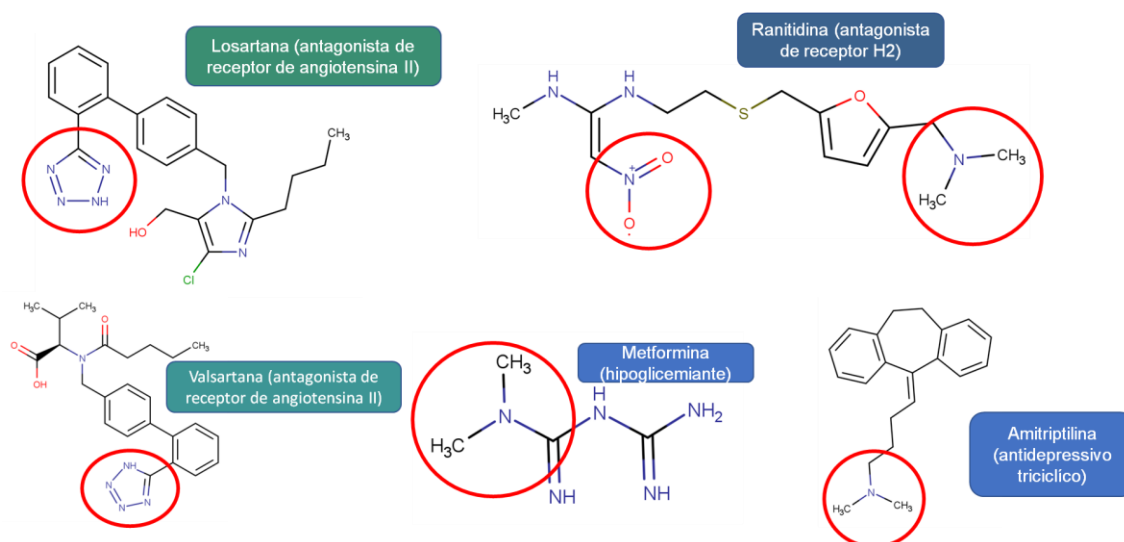


Figura 3. Fármacos propensos à formação de nitrosaminas.

No caso da Losartana e da Valsartana, a formação de nitrosaminas está relacionada com a síntese do anel tetrazólico da estrutura química. Já nos casos da metformina e amitriptilina podemos visualizar a amina terciária na molécula que pode ser nitrosada caso entre em contato com algum agente nitrosante da formulação ou embalagem (ANVISA, 2021).

2.5. Avaliação do risco toxicológico de N-nitrosaminas conhecidas

Atualmente, a análise de risco para formação de N-nitrosaminas em medicamentos é baseada nos princípios estabelecidos pelo guia ICH Q9 (2015) e no guia nº 50 de 2021 proposto pela ANVISA. Mecanicamente, a análise deve ser realizada em três etapas: (1) avaliação de risco; (2) testes confirmatórios; e (3) alterações pós-registro. A Figura 10 apresenta uma síntese das etapas relacionadas a avaliação de risco e as ações necessárias a ser tomadas após essa avaliação.

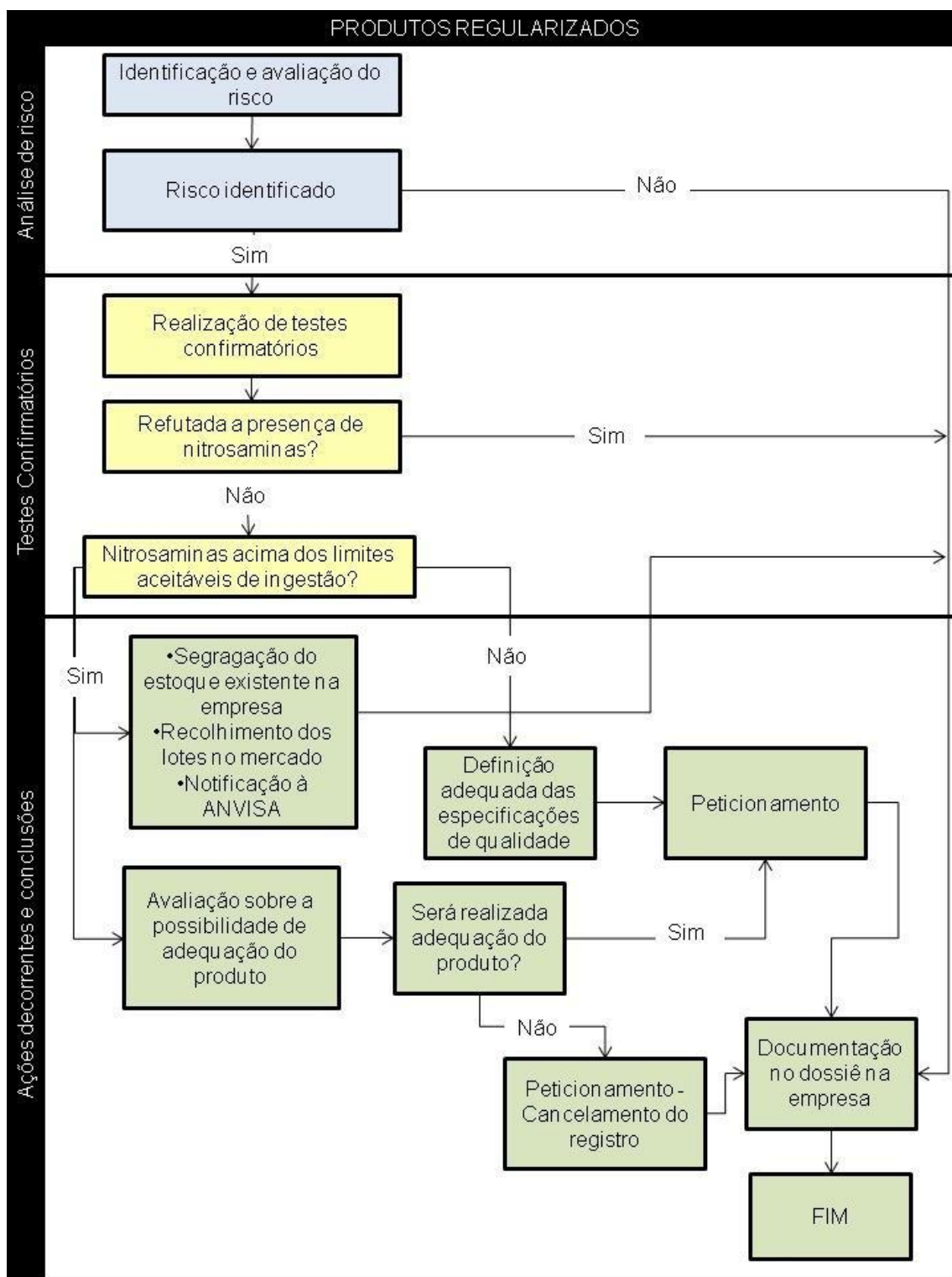


Figura 4. Etapas para a avaliação de risco e ações decorrentes da presença de nitrosaminas (Fonte: ANVISA, 2021 adaptado).

Na avaliação de risco (etapa 1), deve-se identificar o risco de formação de N-nitrosaminas envolvido no processo de síntese do IFA, observando fatores como a

combinação de reagentes, solventes, e materiais de partida utilizados, os intermediários formados, as possíveis impurezas e produtos de degradação. A análise da rota de síntese do IFA, que pode ser feita pelo fabricante, distribuidor ou fracionador do IFA, ou ainda pela fabricante do medicamento, caso esta detenha a rota de síntese completa do ativo. Ademais, o risco deve ser determinado para todo o processo fabricação do produto acabado ou durante o armazenamento ao longo de todo seu curso útil (e.g., possível degradação ou interação com excipientes e material de embalagem) (ANVISA, 2021).

Caso na etapa 1 seja identificado o risco de presença de nitrosaminas, a empresa deve seguir para a Etapa 2 (realização de testes confirmatórios) para confirmar ou não a presença das impurezas no IFA ou produto acabado. Para a realização desses testes o fabricante deve utilizar métodos analíticos adequados e sensíveis. Então, caso os níveis encontrados nos testes estejam abaixo de 10% do limite de ingestão aceitável, considera-se ausência de N-nitrosaminas. No entanto, justificativas podem ser cabíveis quando esses níveis não ultrapassarem o limite de 30% (ANVISA, 2021). De acordo com o guia ICH M7, para cada classe de impureza é necessário um tipo de conduta ou ação de controle. Sendo assim, para as impurezas de classe 1 (carcinógenos mutagênicos conhecidos) deve-se avaliar se a quantidade encontrada durante o processo é superior aos níveis aceitáveis, caso seja, é necessário avaliar, por exemplo, se durante o processo de síntese/fabricação do produto existem etapas capazes de eliminar a impureza, utilizando o cálculo do fator de purga aliado aos métodos analíticos para detecção. Ao final do processo de síntese/ fabricação, compara-se os níveis encontrados no produto final com os níveis aceitáveis para esse produto específico e aplica-se estratégias de controle.

Caso se identifique N-nitrosaminas acima do limite aceitável, os responsáveis legais dos produtos devem protocolar junto à Anvisa a solicitação de recolhimento voluntário dos lotes afetados. Esta comunicação deve ser imediata e a empresa deve avaliar o risco dessa ingestão para os pacientes e tomar as medidas cabíveis para que se diminua o risco da exposição (ANVISA, 2021). Por último, após a conclusão da etapa dos testes confirmatórios, o fabricante deve protocolar junto a agência sanitária as petições pós-registro, quando aplicáveis. Além da inclusão de testes confirmatórios na especificação do produto, outras alterações pós-registro podem ser aplicadas para reduzir o risco da presença de nitrosaminas (ANVISA, 2021).

2.5.1. Avaliação do risco toxicológico de novas N-nitrosaminas

A ICH M7 estabelece que o gerenciamento de risco de segurança e qualidade no estabelecimento de níveis de impurezas mutagênicas deve envolver uma revisão da literatura e a pesquisa por evidências de carcinogenicidade e mutagenicidade bacteriana (Ames) em bancos de dados. O potencial mutagênico/carcinogênico das impurezas pode ser classificado em cinco categorias, conforme descrito no Quadro 4 (ICH, 2017; PEDREIRO, 2016).

Quadro 4. Sistema de classificação de impureza em relação ao potencial mutagênico/carcinogênico e ações de controle (Fonte: ICH, 2017).

Classe	Definição	Ações de controle
1	Conhecidamente mutagênicos carcinogênicos.	Controlar no limite aceitável específico para o componente ou abaixo deste.
2	Mutagênicos com potencial carcinogênico desconhecido (resultado positivo para mutagenicidade em teste com bactérias, sem dado de carcinogenicidade com roedores).	Controlar no limite aceitável ou abaixo deste (TTC apropriado).
3	Alerta estrutural, sem relação com a estrutura da substância do medicamento; sem dado de mutagenicidade.	Controlar no limite aceitável ou abaixo deste (segundo TTC1 apropriado) ou conduzir ensaio de mutagenicidade; se mutagênico = classe 2; se não mutagênico = classe 5.
4	Alerta estrutural, com alerta similar na substância do medicamento ou componentes relacionados à substância do medicamento os quais foram testados e são não-mutagênicos.	Tratar como impureza não mutagênica.
5	Sem alertas estruturais, ou com alertas estruturais com dados suficientes para demonstrar ausência de atividade mutagênica ou carcinogênica.	Tratar como impureza não mutagênica.

Threshold of Toxicological Concern (TTC): Termo que define uma ingestão aceitável para algum agente químico não estudado que representa um risco negligenciável de carcinogenicidade ou outros efeitos tóxicos.

Caso não sejam encontradas evidências de toxicidade na literatura, uma avaliação toxicológica computacional deve ser realizada usando metodologias de QSAR (do inglês *Quantitative Structure-Activity/Toxicity Relationship*) que predizem o resultado de um ensaio de mutagenicidade bacteriana. De acordo com o ICH M7, duas metodologias de predição que se complementam devem ser exploradas. Uma metodologia deve ser baseada em regras de especialistas (*rule-based expert*) e a segunda metodologia deve ser baseada em QSAR (*statistical-based models*) (ICH, 2017; BENIGNI R. & BOSSA C., 2011).

Os métodos *rule-based expert* são utilizados para verificação de alerta estruturais (subestruturas) frequentemente encontradas em compostos mutagênicos e carcinogênicos. Os alertas estruturais são úteis para estabelecer regras de Relação Estrutura-Toxicidade (STR, *Structure Toxicity Relationship*) e quando possível, determinar o modo de ação associado ao desfecho toxicológico (MYATT GJ, et al., 2018). Em paralelo, uma análise *read-across* (abordagem *rule-based expert*) também pode ser utilizada para avaliação toxicológica *in silico*. Esta abordagem avalia o potencial toxicológico do composto sob investigação com base no índice de similaridade estrutural com compostos análogos com potencial mutagênico ou carcinogênico conhecido. Em outras palavras, a avaliação toxicológica em *read-across* é baseada em interpolações ou extrapolações, de modo que compostos estruturalmente semelhantes possuirão potencial mutagênico e carcinogênico semelhantes. (MYATT GJ, et al., 2018).

Por outro lado, os modelos de QSAR *statistical-based* são utilizados para prever o desfecho toxicológico, ou seja, avaliar o potencial mutagênico *in vitro* de um ou mais compostos não testados frente a cepas de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* (teste Ames). Os modelos de QSAR devem obrigatoriamente seguir os princípios gerais de validação estabelecidos pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), conforme descrito a seguir (OECD, 2004; GAUDIO, A. C. & ZANDONADE, E., 2001; ARROIO A. et al., 2010):

- 1) Utilizar uma propriedade biológica definida;
- 2) Utilizar algoritmo não ambíguos;
- 3) Possuir um domínio de aplicabilidade definido;
- 4) Apresentar medidas adequadas de robustez e previsibilidade;
- 5) Possibilitar uma interpretação mecanística, se possível.

Conforme descrito no Quadro 4 e Figura 11, a ausência de alertas estruturais pelas duas metodologias complementares (*rule-based expert* e *statistical-based expert*) é suficiente para concluir que a impureza não possui potencial mutagênico, e portanto, nenhum teste adicional precisa ser recomendado. Caso necessário, o resultado de qualquer análise computacional pode ser revisado com base na experiência de especialistas. Pois, especialistas poderão fornecer suportes e justificativas adicionais sobre alguma predição para apoiar a conclusão final. Por outro lado, quando a impureza apresentar resultado positivo de predição para mutagenicidade (Classe 3, Quadro 4),

medidas de controle adequadas devem ser aplicadas utilizando um ensaio experimental *in vitro* para avaliação de mutagenicidade Ames da impureza (ICH, 2017).

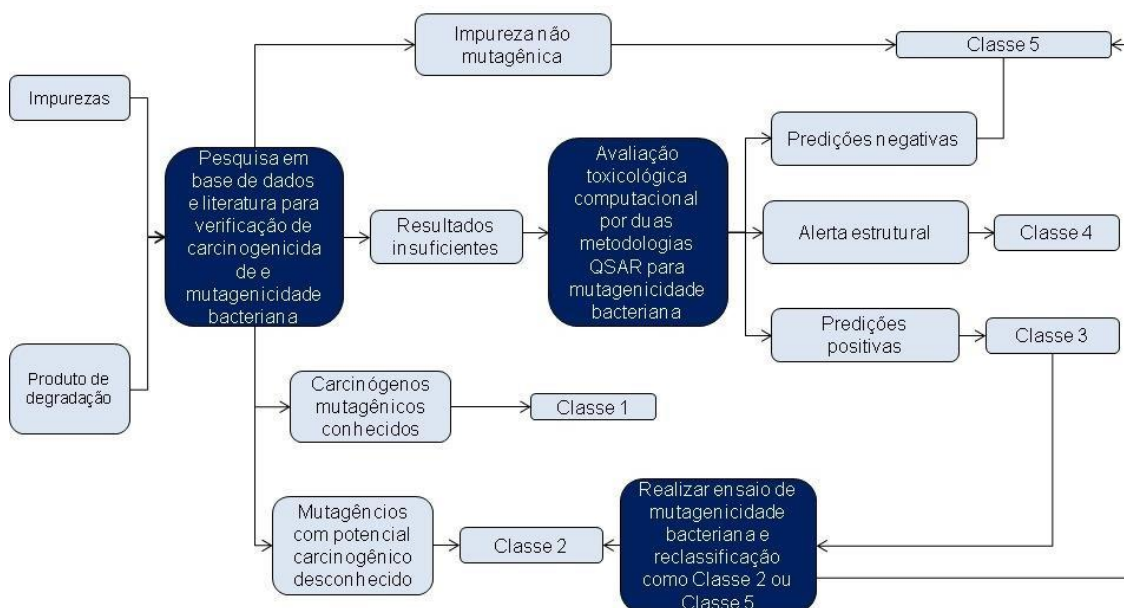


Figura 5. Fluxograma para avaliação toxicológica de impurezas com potencial mutagênico desconhecido.

Segundo o guia OECD nº 471, o teste Ames de mutação reversa bacteriana é capaz de detectar a reversão de mutações, devido a restauração de capacidade da bactéria de sintetizar a histidina (um aminoácido essencial). O teste utiliza pelo menos quatro cepas: cepas de *Salmonella typhimurium* (TA1535; TA1537 ou TA97a ou TA97; TA98; e TA100) e uma cepa de *Escherichia coli* (WP2) ou *S. typhimurium* (TA102). Então uma impureza será classificada como Ames positivo se apresentar resultado positivo em pelo menos um dos experimentos com as cepas padrão. E uma impureza pode ser classificada como Ames negativo se apresentar resultados negativos em todos os experimentos realizados com as cepas padrão. Um ensaio de mutagenicidade Ames negativo, conduzido adequadamente, anularia qualquer potencial mutagênico associado a impureza investigada (Classe 3), e nenhuma outra avaliação de genotoxicidade seria recomendada. Nesse caso, a impureza poderia ser considerada não mutagênica (Classe 5, Quadro 4) (ICH, 2017).

Caso o resultado do teste de mutagenicidade seja positivo, realiza-se uma avaliação de risco adicional e/ou medidas de controle (Classe 2, Quadro 4). Por exemplo, quando os níveis da impureza não podem ser controlados em um limite aceitável apropriado, recomenda-se que a impureza seja testada em um ensaio de

mutação genética utilizando modelos animais (*in vivo*), que irão embasar e apoiar a definição de limites aceitáveis de exposição da impureza investigada (ICH, 2017).

3. Conclusão

As N-nitrosaminas fazem parte de uma lista de substâncias monitoradas internacionalmente por causa do seu potencial mutagênico e carcinogênico. No entanto, o tempo e os níveis de exposição são importantes para a avaliação do risco de desenvolvimento de um câncer. É essencial a avaliação e monitoramento dessas substâncias nos Insumos Farmacêuticos Ativos e medicamentos, adotando estratégias de controle capazes de mapear todas as etapas do processo de fabricação de um medicamento. É necessária atenção aos intermediários do processo, materiais de embalagem e Boas Práticas de Fabricação, para garantir que o paciente não seja exposto a níveis acima do permitido ao utilizar um medicamento.

REFERÊNCIAS

37TH JOINT MEETING OF THE CHEMICALS COMMITTEE et al. OECD principles for the validation, for regulatory purposes, of (quantitative) structure–activity relationship models. 2019.

ADAMSON, Richard H.; CHABNER, Bruce A. The finding of N-nitrosodimethylamine in common medicines. **The Oncologist**, v. 25, n. 6, p. 460-462, 2020.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Adoção de medidas para medicamentos para pressão alta, 08 de maio de 2019. Disponível em: http://antigo.anvisa.gov.br/pt_BR/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/adocao-de-medidas-para-medicamentos-para-pressao-alta/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=pt_BR. Acesso em: 04/03/2022.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos. Guia N° 50/2021 – versão 1. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6279847/\(1\)Guia_50_Nitrosaminas_rev_final_para+publicação.pdf/12af2904-e5a7-4774-9528-f4f633cac2bf](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6279847/(1)Guia_50_Nitrosaminas_rev_final_para+publicação.pdf/12af2904-e5a7-4774-9528-f4f633cac2bf). Acesso em: 10/12/2021.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Parecer n°5/2021/SEI/GIMED/GGFIS/DIRE4/ANVISA, 2021. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6279847/Parecer+com+as+motiva%C3%A7%C3%B5es+de+dispensa+de+AIR.pdf/6574a23e-7418-4dfb-bd74-c9cae143c653>. Acesso em: 06/03/2022.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Perguntas e Respostas: Assunto: RDC 53/2015 e Guia 4/2015 de 04 de outubro de 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/perguntas-e-respostas-rdc-53-2015-e-guia-04-2015.pdf/view>. Acesso em: 14/02/2022.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da Diretoria Colegiada- RDC N° 283, de 17 de maio de 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-283-de-17-de-maio-de-2019-118357341>. Acesso em: 22/12/2021.

ARROIO, Agnaldo; HONÓRIO, Káthia M.; DA SILVA, Albérico BF. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, p. 694-699, 2010.

BENIGNI, Romualdo; BOSSA, Cecilia. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity: a review with implications for predictive toxicology. **Chemical reviews**, v. 111, n. 4, p. 2507-2536, 2011.

CANAES, Larissa de Souza. Desenvolvimento de métodos para determinação de N-nitrosaminas em amostras de xampu por cromatografia líquida acoplada à detecção por arranjo de diodos, eletroquímica e espectrometria de massas.

CARLSON, Erik S.; UPADHYAYA, Pramod; HECHT, Stephen S. A general method for detecting nitrosamide formation in the in vitro metabolism of nitrosamines by cytochrome P450s. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 127, p. e56312, 2017.

CFE. CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA. Nota Técnica nº 01/2020 Comunicado à população Presença de N-nitrosoaminas em medicamentos. Disponível em: https://www.cff.org.br/userfiles/file/cebrim/Notas%20Técnicas/Nota_Técnica_012020_final.pdf. Acesso em: 12/12/2021.

CHU, F. S.; LI, G. Y. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in moldy corn collected from the People's Republic of China in regions with high incidences of esophageal cancer. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 3, p. 847-852, 1994.

CMS. CIENTÍFICA DO BRASIL. Orientação para o controle de impurezas de nitrosaminas em medicamentos, 2021. Disponível em: <https://cmscientifica.com.br/orientacao-para-controle-de-impurezas-de-nitrosaminas-em-medicamentos/>. Acesso em: 06/03/2022.

DANTAS, Rosângela Honorato; BIDOIA, Beatriz Gulli; ROSTELATO-FERREIRA, Sandro. Determinação do teor de nitrito em amostras de salsicha industrializada. **Saúde em Revista**, v. 17, n. 46, p. 29-34, 2017.

DUTRA, Camila BRAGA; RATH, S.; GUILLERMO REYES REYES, F. Nitrosaminas voláteis em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 18, n. 1, p. 111-120, 2008.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. ICH guideline Q9 on quality risk management, 2015. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/international-conference-harmonisation-technical-requirements-registration-pharmaceuticals-human-use_en-3.pdf. Acesso em: 06/03/2022.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Lessons learnt from presence of N-nitrosamine impurities in sartan medicines - Overview and recommendations. EMA/526934/2019, 2020. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/lessons-learnt-presence-n-nitrosamine-impurities-sartan-medicines_en.pdf. Acesso em: 03/01/2022.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Meeting highlights from the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/news/meeting-highlights-committee-medicinal-products-human-use-chmp-23-26-april-2019>. Acesso em: 13/02/2022.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Nitrosamine impurities in human medicinal products Procedure under Article 5(3) of Regulation EC (No) 726/2004, 2020. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/referral-procedures/article-53-opinions>. Acesso em: 20/12/2021.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal

products, 2019. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-questions-answers-marketing-authorisation-holders/applicants-chmp-opinion-article-53-regulation-ec-no-726/2004-referral-nitrosamine-impurities-human-medicinal-products_en.pdf. Acesso em: 27/12/2021.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Suspension of ranitidine medicines in the UE, 2020. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/suspension-ranitidine-medicines-eu_en.pdf. Acesso em: 24/01/2022.

EMA. EUROPEAN MEDICINES AGENCY. Update on nitrosamine impurities: EMA continues to work to prevent impurities in medicines. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/update-nitrosamine-impurities-ema-continues-work-prevent-impurities-medicines_en.pdf. Acesso em: 13/02/2022.

EUROPEAN DIRECTORATE FOR THE QUALITY OF MEDICINES. Report from the CMDh meeting held on 26-27 January 2021: Rifampicin-containing medicinal products. Disponível em: https://www.bfarm.de/SharedDocs/Downloads/DE/Arzneimittel/Pharmakovigilanz/PSU/SAS/s-z/tramadol_beschluss_cmdh_anl4.pdf?_blob=publicationFile. Acesso em: 13/02/2022.

FAN, T. Y. et al. N-Nitrosodiethanolamine in cosmetics, lotions and shampoos. **Food and cosmetics toxicology**, v. 15, n. 5, p. 423-430, 1977.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. "FDA solicita recall de todos os produtos à base de ranitidina (Zantac)", 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/la-fda-solicita-el-retiro-del-mercado-de-todos-los-productos-hechos-base-de-ranitidina-zantac>. Acesso em: 24/01/2022.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs. Guidance for Industry. 2021. Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-nitrosamine-impurities-human-drugs>. Acesso em: 18/01/2022.

FRATUCCI, Andréia; SILVA, Luciana; GUEDES, Maria do Carmo Santos. Nitratos, nitritos e n-nitrosaminas: efeitos no organismo. **Revista Eletrônica FACP**, n. 18, 2020.

GAUDIO, A. C.; ZANDONADE, E. Proposição. Validação e Análise dos Modelos que Correlacionam Estrutura Química e Atividade Biológica. **Quim. Nova**, v. 24, n. 5, p. 658-671, 2001.

GOVERNMENT OF CANADÁ. Amitriptyline antidepressant drugs recalled because of a nitrosamine impurity, 2022. Disponível em: <https://recalls-rappels.canada.ca/en/alert-recall/amitriptyline-antidepressant-drugs-recalled-because-nitrosamine-impurity>. Acesso em: 07/02/2022.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Stability testing of new drug substances and products Q1A(R2), 2003. Disponível

em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-1-r2-stability-testing-new-drug-substances-products-step-5_en.pdf. Acesso em: 25/02/2022.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Impurities in new drug substances Q3A(R2), 2006. Disponível em: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3A%28R2%29%20Guideline.pdf>. Acesso em: 25/02/2022.

ICH. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Impurities in new drug products Q3B(R2), 2006. Disponível em: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q3B%28R2%29%20Guideline.pdf>. Acesso em: 25/02/2022.

ICH. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. Impurities: guideline for residual solvents Q3C(R8), 2021. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/regulatory-procedural-guideline/ich-guideline-q3c-r8-impurities-guideline-residual-solvents-step-5_en.pdf. Acesso em: 25/02/2022.

ICH. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. M7 (R1) - Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk, 2017. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m7r1-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit_en.pdf. Acesso em 10/02/2022.

ICTQ. INSTITUTO DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E QUALIDADE. Impurezas em Fármacos e Medicamentos, 2009. Disponível em: <https://ictq.com.br/opinia0/316-impurezas-em-farmacos-e-medicamentos>. Acesso em: 10/02/2022.

IKEDA, Kane; MIGLIORESE, Kenneth G.; CURTIS, Helene. Analysis of nitrosamines in cosmetics. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, v. 41, n. 5, p. 283-333, 1990.

IN SILICALL. A química das nitrosaminas, 2021. Disponível em: <https://insilicall.com/a-quimica-das-nitrosaminas/>. Acesso em: 06/03/2022.

KAZMI, Sayada Reemsha et al. In silico approaches and tools for the prediction of drug metabolism and fate: A review. **Computers in Biology and Medicine**, v. 106, p. 54-64, 2019.

KING, Fiona J.; SEARLE, Andrew D.; URQUHART, Michael W. Ranitidine—investigations into the root cause for the presence of N-nitroso-N, N-dimethylamine in ranitidine hydrochloride drug substances and associated drug products. **Organic Process Research & Development**, v. 24, n. 12, p. 2915-2926, 2020.

KLEIN, David R. **Organic Chemistry**, John Wiley & Sons, 2020.

KOJIĆ-PRODIĆ, B.; RUŽIĆ-TOROŠ, Ž.; TOSO, R. Structure of a new H₂-receptor antagonist, 2-(2-([5-(dimethylammoniomethyl)-2-furyl] methylthio) ethylamino)-2-methylamino-1-nitroethylene hydrogen oxalate (ranitidine hydrogen oxalate). **Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry**, v. 38, n. 6, p. 1837-1840, 1982.

LIN, Jen-Kun. Nitrosamines as potential environmental carcinogens in man. **Clinical biochemistry**, v. 23, n. 1, p. 67-71, 1990.

LOEPPKY, Richard N. Nitrosamine and N-nitroso compound chemistry and biochemistry: advances and perspectives. 1994.

MAGEE, Peter N.; BARNES, J. M. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. **British journal of cancer**, v. 10, n. 1, p. 114, 1956.

MAPA. MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 51 de 29/12/2006. Disponível em: https://www.normasbrasil.com.br/norma/instrucao-normativa-51-2006_76049.html. Acesso em: 21/12/2021.

MIRMEHRABI, Mahmoud et al. Characterization of tautomeric forms of ranitidine hydrochloride: thermal analysis, solid-state NMR, X-ray. **Journal of crystal growth**, v. 260, n. 3-4, p. 517-526, 2004.

MIRVISH, Sidney S. Formation of N-nitroso compounds: chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 31, n. 3, p. 325-351, 1975.

MYATT, Glenn J. et al. In silico toxicology protocols. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 96, p. 1-17, 2018.

OECD. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Guidance document on the validation of (quantitative) structure-activity relationship [(q)sar] models. Paris, 2007. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264085442-en.pdf?expires=1647385509&id=id&accname=guest&checksum=D41A29F3D76DEC28720019A218C433BE>. Acesso em: 26/02/2022.

PEDREIRO, Estela Sílvia Duarte. **Análise in silico de impurezas provenientes da síntese de fármacos: pesquisa de estruturas de alerta de genotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade**. 2016. Tese de Doutorado.

PREUSSMANN, R. Occurrence and exposure to N-nitroso compounds and precursors. **IARC scientific publications**, n. 57, p. 3-15, 1984.

PUBCHEM. Compound summary Ranitidine. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ranitidine>. Acesso em: 14/02/2022.

RATH, Susanne; CANAES, Larissa S. Contaminação de produtos de higiene e cosméticos por N-Nitrosaminas. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2159-2168, 2009.

RODRIGUES, Rodrigo LB et al. Predição de toxicidade dos estabilizantes usuais em propelentes à base de nitrocelulose e de seus principais produtos de degradação. **Química Nova**, v. 41, p. 867-873, 2018.

SANOFI MEDLEY FARMACÊUTICA LTDA. Recolhimento voluntário e preventivo de todos os lotes do medicamento Valtrian® HCT 50mg + 12,5mg e Valtrian® 50mg e 100mg comprimidos, 2022. Disponível em: <https://www.sanofi.com.br/pt/quem-somos/imprensa/releases/2022-02-10-recolhimento-valtrian>. Acesso em: 07/04/2022.

SHENOY, Narmada R.; CHOUGHULEY, Ahmed SU. Effect of certain plant phenolics on nitrosamine formation. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 37, n. 3, p. 721-725, 1989.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Information Note Nitrosamines Impurities, 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/20-11-2019-information-note-nitrosamine-impurities>. Acesso em: 21/12/2021.