

Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos

Guia nº 50/2021 – versão 4



Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa

2024

Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos

VIGENTE A PARTIR DE 01/08/2024

Este Guia expressa o entendimento da Anvisa sobre as melhores práticas com relação a procedimentos, rotinas e métodos considerados adequados ao cumprimento de requisitos técnicos ou administrativos exigidos pelos marcos legislativo e regulatório da Agência.¹

Trata-se de instrumento regulatório não normativo, de caráter recomendatório e não vinculante, sendo, portanto, possível o uso de abordagens alternativas às proposições aqui dispostas, desde que compatíveis com os requisitos relacionados ao caso concreto. A inobservância ao conteúdo deste documento não caracteriza infração sanitária, nem constitui motivo para indeferimento de petições, desde que atendidos os requisitos exigidos pela legislação.

As recomendações contidas neste Guia produzem efeitos a partir da data de sua publicação no Portal da Anvisa.

¹[Portaria nº 162, de 12 de março de 2021](#), que dispõe sobre as diretrizes e os procedimentos para melhoria da qualidade regulatória na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa).

Copyright©2024. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. A reprodução parcial ou total deste documento por qualquer meio é totalmente livre, desde que citada adequadamente a fonte. A reprodução para qualquer finalidade comercial está proibida.

SUMÁRIO

1. ESCOPO.....	4
2. INTRODUÇÃO.....	4
3. BASE LEGAL.....	5
4. ASPECTOS QUÍMICOS E REACIONAIS.....	7
a) Formação de nitrosamina como contaminante em processo de obtenção de Insumos Farmacêuticos Ativos.....	10
b) Formação de nitrosamina como contaminante em processo de fabricação de medicamentos.....	13
5. GERENCIAMENTO DE RISCO.....	14
6. FATORES DE PRIORIZAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DE RISCO (ETAPA 1).....	18
a) Componentes básicos.....	18
b) Avaliação de purga.....	19
7. TESTES CONFIRMATÓRIOS (ETAPA 2).....	20
a) Método analítico.....	20
b) Lotes a serem tratados.....	20
8. ESTRATÉGIA DE CÁLCULO PARA ATRIBUIÇÃO DE LIMITES DE ACEITAÇÃO.....	21
a) Limites para nitrosamina única.....	22
b) Mais de uma nitrosamina.....	23
c) Nitrosaminas novas.....	24
d) Abordagem <i>Less Than Lifetime</i>	24
9. GLOSSÁRIO.....	25
10. REFERÊNCIAS.....	26
ANEXO I: Limites de aceitação para nitrosaminas.....	30
ANEXO II : Abordagem de Categorização de Potência Carcinogênica para N-nitrosaminas - CPCA.....	32
CÁLCULO DA PONTUAÇÃO DE POTÊNCIA.....	34
ANEXO III: Condições do teste de Ames otimizado para N-nitrosaminas.....	38

1. ESCOPO

Este documento apresenta recomendações quanto ao controle de nitrosaminas em todos os Insumos Farmacêuticos Ativos (IFAs) sintetizados quimicamente e medicamentos para uso humano que os contenham, bem como produtos biológicos, quando cabível.

As recomendações são igualmente aplicáveis para alterações pós-registro que possam resultar em formação de nitrosaminas, como mudanças relacionadas ao IFA, à composição e à embalagem do medicamento, não se restringindo exclusivamente a essas.

2. INTRODUÇÃO

As *N*-nitrosaminas constituem uma classe de compostos caracterizados pela ligação de um grupo nitroso (-N=O) a um grupo funcional amina (-NR₂). Dentre os compostos desta classe, estão alguns agentes mutagênicos, genotóxicos e potencialmente carcinogênicos em humanos e, por esse motivo, devem ser controlados a níveis considerados aceitáveis e seguros. Esses compostos podem ser encontrados na água, carne curada, peixe processado, cerveja e outras bebidas alcoólicas e não alcoólicas, queijo, molho de soja, óleos, vegetais processados e leite humano e sua exposição dentro de limites seguros representa baixo risco de agravos à saúde (EFSA CONTAM Panel, 2023) (EMA 2020). No entanto, a exposição acima de níveis aceitáveis e por longo período pode aumentar o risco de câncer (Horne et al., 2023).

Em 2018, as agências reguladoras em todo o mundo ficaram cientes da presença de nitrosaminas acima dos níveis permitidos em medicamentos, após fabricantes de insumos farmacêuticos ativos do grupo de medicamentos comumente denominados de “sartanas” – os antagonistas dos receptores de angiotensina II, utilizados para controle da pressão arterial – emitirem alertas de sua possível presença nessa classe de medicamentos.

Desde então, essas agências têm promovido ações no intuito de proteger a saúde dos pacientes da exposição às nitrosaminas em medicamentos acima dos níveis considerados aceitáveis. No Brasil, as ações de controle promovidas pela Anvisa foram iniciadas com inspeções realizadas em 30 empresas fabricantes de medicamentos, com 111 produtos tendo sido inspecionados. Como resultado, 31 ações sanitárias foram efetuadas, incluindo interdições, suspensões e recolhimentos. A fonte da contaminação dos medicamentos foi identificada como sendo oriunda principalmente da presença de solventes em condições químicas que favorecem a formação de nitrosaminas.

Diante do caso das “sartanas”, as principais agências reguladoras do mundo, juntamente com as empresas fabricantes de medicamentos, começaram a investigar se outros medicamentos também poderiam apresentar nitrosaminas acima de níveis aceitáveis. Em 2019, foi reportada a presença de nitrosaminas em outras classes de medicamentos, como nizatidina, ranitidina e metformina. Adicionalmente, foi evidenciada possível formação de nitrosaminas a partir do material de embalagem primária contendo nitrocelulose. Desde então, tem sido observada formação de nitrosaminas em diversos outros medicamentos, por exemplo naqueles contendo vareniclina, rifampicina, diosmina e sitagliptina.

Como parte desse processo de investigação, constatou-se, por exemplo, que a presença de nitrosaminas em ranitidina apresentou uma fonte diversa da anteriormente encontrada em outros produtos. Para este fármaco, a formação de dimetilnitrosamina (NDMA) é originária de uma degradação intermolecular que ocorre ao longo do armazenamento do produto, e que pode ser influenciada pela morfologia do cristal da molécula (King et al. 2020), além de ser acelerada pelo armazenamento em temperaturas superiores à temperatura ambiente. Tais condições podem resultar em exposição do consumidor a níveis inaceitáveis dessa

impureza (FDA 2020b).

Na Europa, nos meses seguintes à descoberta, diversos fabricantes do insumo ranitidina tiveram seus Certificados de Adequabilidade (Certificate of Suitability - CEP) revogados pelo European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM). Destaca-se ainda que os medicamentos contendo cloridrato de ranitidina estiveram disponíveis para a população mundial por mais de 30 anos e foram usados para o tratamento de úlceras, esofagites e refluxos gástricos, sem notificações de eventos adversos graves, o que reforça a necessidade de avaliação e controle das nitrosaminas em todas as classes de medicamentos.

É importante enfatizar que embora exista um risco muito baixo de nitrosaminas estarem presentes em produtos biológicos, estes não podem ser definitivamente descartados. À luz do conhecimento científico atual, sabe-se que tais riscos se concentram, por exemplo, em produtos com fragmentos sintetizados quimicamente, aqueles embalados em blisters contendo nitrocelulose, produtos biológicos com excipientes em sua composição, ou em que haja a adição intencional de agentes nitrosantes no processo de fabricação (EMA, 2020).

Neste sentido, embora não se espere que as nitrosaminas se formem durante a fabricação da maioria dos IFAs e dos produtos acabados (EMA 2020b), recomenda-se fortemente que os fabricantes, distribuidoras e fracionadoras de IFAs e empresas fabricantes e importadoras de medicamentos avaliem seus produtos quanto à possível presença destes contaminantes e, tomem as medidas de precaução necessárias para minimizar o risco e garantir a segurança desses produtos.

Este guia apresenta conceitos básicos acerca da formação, gerenciamento do risco relativo à presença, além de recomendações sobre controle de nitrosaminas em insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, bem como esclarece a responsabilidade das empresas, apresenta estratégias de cálculos de limites e aborda outros conceitos.

Ressalta-se que este é um documento que pode ser alterado à medida que novos estudos e informações estejam disponíveis no que tange a essa área do conhecimento, incluindo limites aceitáveis de exposição às nitrosaminas, tendo em vista a ausência de estudos conclusivos sobre a ingestão a longo prazo.

É importante registrar a cooperação regulatória internacional sobre esse tema. Em 2018, foi formado um grupo estratégico composto de agências reguladoras de diversos países para tratar o assunto, o NISG, "*Nitrosamines International Strategic Group*". Em 2020, foi estabelecido um grupo derivado do NISG, o NITWG, ou grupo técnico de trabalho internacional de nitrosaminas (*Nitrosamines International Technical Working Group*) com atribuição de endereçar de forma mais aprofundada os temas técnicos ligados à nitrosaminas. A Anvisa faz parte desses grupos desde 2021.

3. BASE LEGAL

Lei nº 6.360, de 23 de setembro de 1976, que dispõe sobre a vigilância sanitária a que ficam sujeitos os medicamentos, as drogas, os insumos farmacêuticos e correlatos, cosméticos, saneantes e outros produtos;

Resolução RDC nº 73, de 07 de abril de 2016, que dispõe sobre mudanças pós-registro, cancelamento de registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos;

Resolução RDC nº 76, de 02 de maio de 2016, que dispõe sobre a realização de alteração, inclusão e cancelamento pós-registro de medicamentos específicos.

Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos;

Resolução RDC nº 753, de 28 de setembro de 2022, que dispõe sobre os critérios para a concessão do registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos, classificados como

novos, inovadores, genéricos e similares;

Resolução RDC nº 359, de 27 de março de 2020, que institui o Dossiê de Insumo Farmacêutico Ativo (DIFA) e a Carta de Adequação de Dossiê de Insumo Farmacêutico Ativo (CADIFA);

Resolução RDC nº 412, de 20 de agosto de 2020, que estabelece os requerimentos e condições para a realização de estudos de estabilidade para fins de registro e alterações pós-registro de produtos biológicos;

Instrução Normativa nº 65, de 20 de agosto de 2020, regulamenta a classificação das alterações pós-registro e condições e documentos técnicos necessários para instruir as petições de alteração pós-registro e de cancelamento de registro dos produtos biológicos;

Resolução RDC nº 511, de 27 de maio de 2021, que dispõe sobre a admissibilidade de códigos farmacêuticos estrangeiros.

Resolução RDC nº 413, de 20 de agosto de 2020, que dispõe sobre alterações pós-registro e cancelamento de registro de produtos biológicos;

Resolução RDC nº 576, de 11 de novembro de 2021, que dispõe sobre a notificação de medicamentos de baixo risco;

Resolução RDC nº 625, de 09 de março de 2022, que dispõe sobre os requisitos mínimos relativos à obrigatoriedade, por parte das empresas detentoras de registros de medicamentos, de comunicação da implementação da ação de recolhimento de medicamentos às autoridades sanitárias competentes e aos consumidores, em hipótese de indícios suficientes ou comprovação de desvio de qualidade que representem risco, agravo ou consequência à saúde, bem como por ocasião de cancelamento de registro relacionado à segurança e eficácia;

Resolução RDC nº 654, de 24 de março de 2022, que dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Insumos Farmacêuticos Ativos;

Resolução RDC nº 658, de 30 de março de 2022, que dispõe sobre as diretrizes gerais de boas práticas de fabricação de medicamentos;

Resolução RDC nº 677, de 28 de abril de 2022, que dispõe sobre avaliação de risco e controle de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em Insumos Farmacêuticos Ativos (IFA) e medicamentos de uso humano.

4. ASPECTOS QUÍMICOS E REACIONAIS

As *N*-nitrosaminas possuem a fórmula geral descrita a seguir:

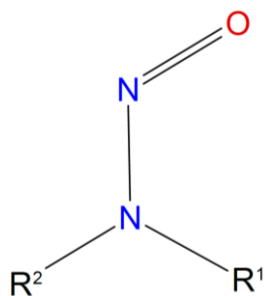


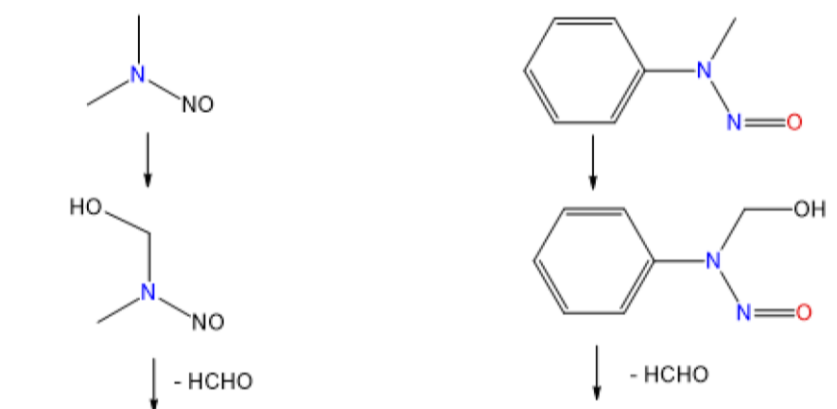
Figura 1- Estrutura geral de *N*-nitrosaminas.

A química das nitrosaminas tem sido estudada e documentada desde o século passado, tendo esse campo de estudos sido impulsionado na década de 1950 pelas observações de Magee e Barnes (1956) que relacionaram essas substâncias ao surgimento de câncer. Dados obtidos na Noruega, no final da década de 50 e início da década de 60, já apontavam a presença de nitrosaminas como causa de hepatotoxicidade em animais alimentados com ração tratada com nitrito (Ender et al. 1964).

Adimetilnitrosamina (NDMA) é atualmente classificada pelo IARC como provavelmente carcinogênica para humanos (grupo 2A) (IARC 1987), enquanto duas nitrosaminas específicas do tabaco (ou seja, 4-(*N*-nitrosometilamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) e *N*'-nitrosornicotina (NNN)) são categorizados como carcinogênicos para humanos (grupo 1) (IARC 2007).

A existência desses compostos é disseminada. Fong e Chan (1973) observaram que a capacidade dos *Staphylococcus aureus* reduzir NO_3^- (nitrato) a NO_2^- (nitrito) a partir de sais presentes em pescados, poderia levar à produção de nitrosaminas por meio da reação do nitrito formado com a trimetilamina, substância presente em grandes quantidades em peixes em decomposição. Água e alimentos defumados também são comumente citados como fontes de nitrosaminas.

A genotoxicidade das nitrosaminas é dependente da hidroxilação do carbono alfa, que ocorre através de enzimas do sistema microsossomal P-450 (CYP 450). A ativação envolve a produção de íons diazônio, que se decompõem levando à formação de carbocátions, que são espécies positivamente carregadas e eletrofílicas capazes de se ligarem ao DNA (Rath & Canaes 2009, Carlson et al. 2017). Atualmente, dados de estudos em animais de 228 nitrosaminas revelam que 82% são considerados carcinógenos *in vivo* (Thresher et al. 2020); independente da via administrada (Li & Hecht 2022, Preussmann & Stewart 1984).



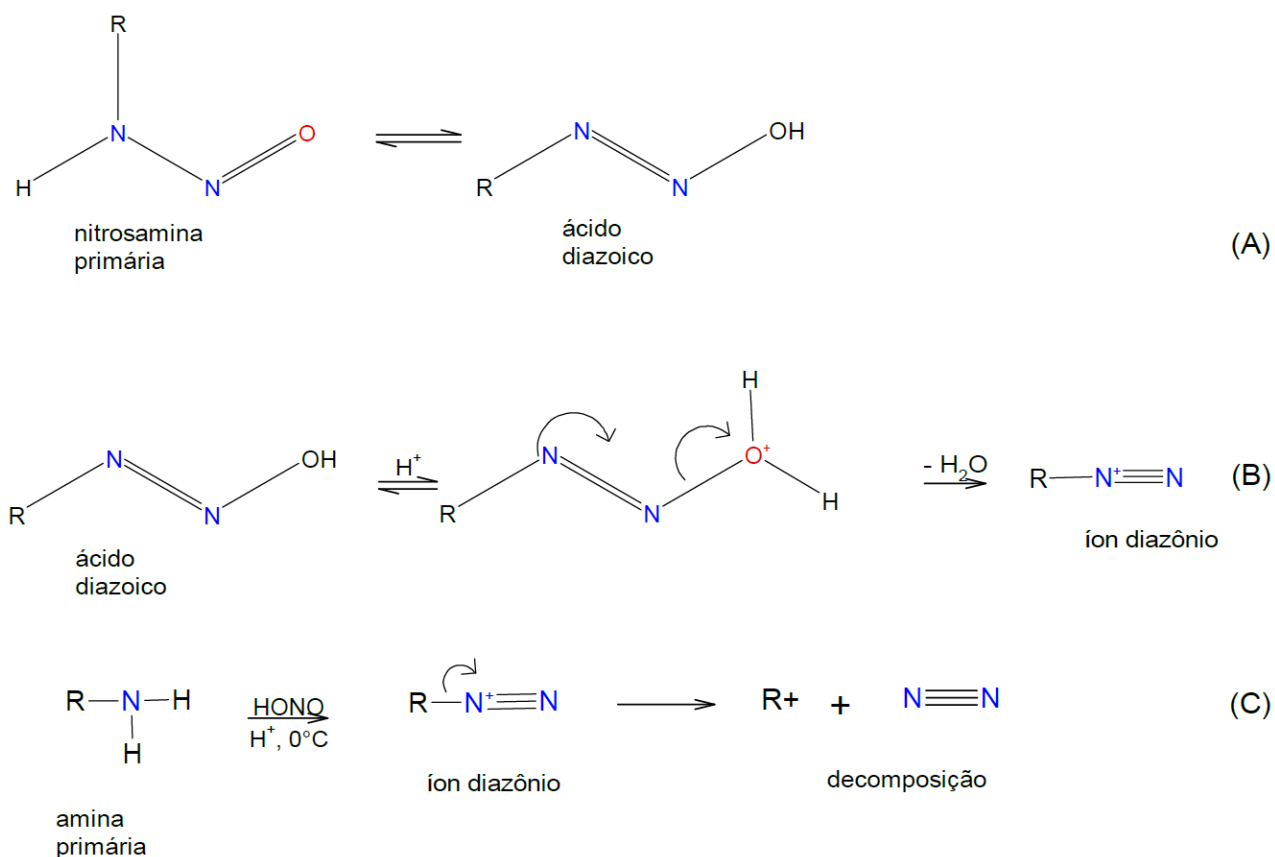


Figura 4 - Formação de carbocátion a partir de amins primárias.

A estrutura da nitrosamina obtida ao final do processo de nitrosação será determinada primariamente pela estrutura da amina que foi nitrosada. Como exemplo, a formação da dimetilnitrosamina (NDMA) a partir da nitrosação da dimetilamina (DMA) é ilustrada conforme a reação a seguir:

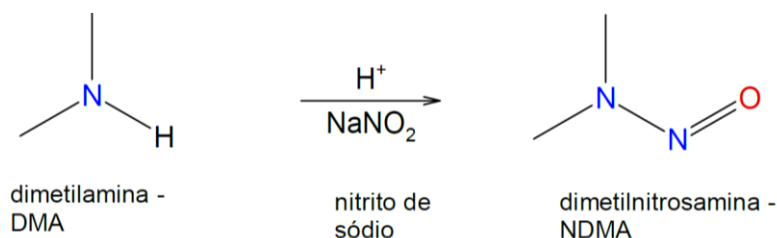


Figura 5 - Nitrosação da dimetilamina (DMA) e formação de dimetilnitrosamina (NDMA).

Da mesma forma, a nitrosação do ácido N-metil-4-aminobutanóico (MBA) leva a formação do carboxipropilmetilnitrosamina (NMBA):

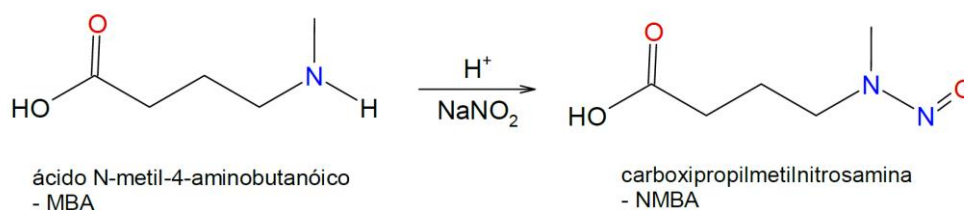


Figura 6 - Nitrosação do ácido N-metil-4-aminobutanóico (MBA) e formação do carboxipropilmetilnitrosamina (NMBA).

Tanto a NDMA quanto a NMBA foram detectadas como impurezas advindas da síntese de IFAs antagonistas dos receptores de angiotensina II (EMA 2020, FDA 2020). As reações acima descrevem o que provavelmente ocorreu para que fossem geradas as nitrosaminas NDMA e NMBA, ou seja, formação de ácido nitroso *in situ* oriundo da presença de nitrito de sódio, levando a formação do agente nitrosante (NO⁺) e consequente nitrosação das amins DMA e MBA, conforme Figura 3A (EMA 2020).

Sabe-se que outros compostos contendo grupos NOx, como sais de nitrito e nitritos de alquila, anidrido nitroso (N₂O₃), tetróxido de dinitrogênio (N₂O₄), haletos de nitrosila (NOCl), nitrosiltiocianato e nitrosofenol, dentre outros, são capazes de nitrosar aminas (Fig. 7 a 9). Processos como cura da carne, maltagem antes da fermentação ou durante reações químicas podem levar a produção de alguns desses compostos. O óxido nítrico é capaz de nitrosar na presença de metais e compostos organometálicos (EMA 2020a).

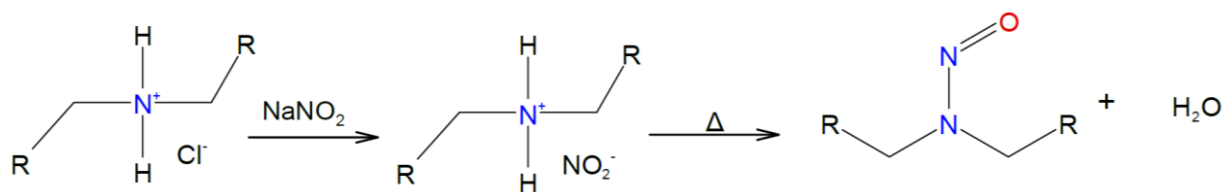


Figura 7 - Formação de nitrosamina secundária a partir de sal de amônio e nitrito de sódio.

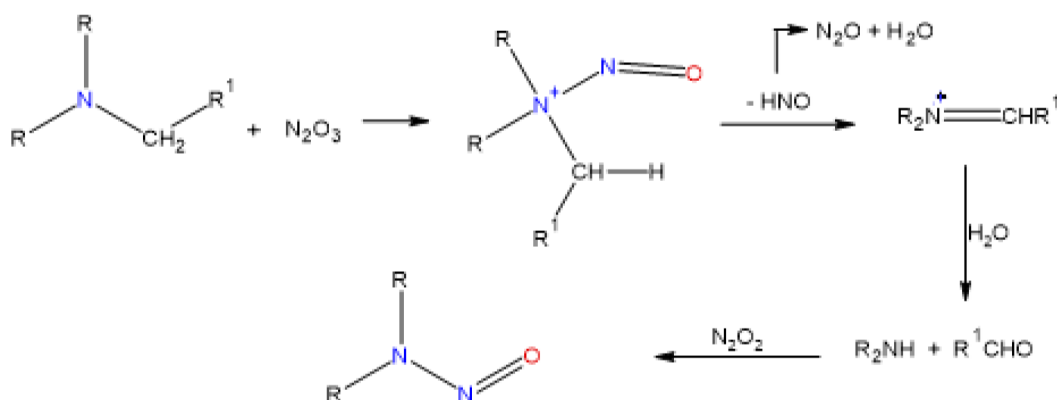


Figura 8 - Formação de nitrosamina a partir de amina terciária e N₂O₃ como agente nitrosante.

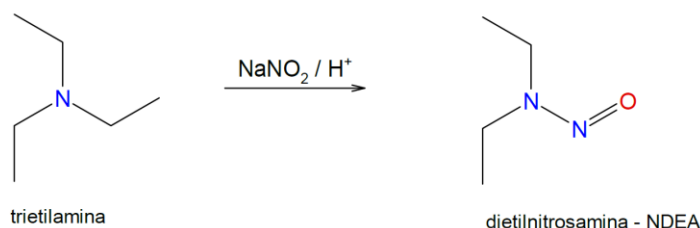


Figura 9- Desalquilação nitrosativa da trietilamina e formação da nitrosamina dietilnitrosamina (NDEA).

A formação de nitrosaminas a partir de aminas terciárias é, geralmente, um processo mais lento do que o processo de nitrosação de aminas secundárias, pois envolve uma etapa de dealquilação, seguida de nitrosação da amina dealquilada e, no que tange a formação de nitrosaminas simples, derivadas de trialkilaminas, espera-se um risco muito menor quando comparado à formação de nitrosaminas derivadas de aminas secundárias, embora essa reatividade reduzida possa não ocorrer com aminas terciárias mais complexas (López-Rodríguez et al., 2020 e Ashworth et al., 2023).

a) Formação de nitrosamina como contaminante em processo de obtenção de Insumos Farmacêuticos Ativos

Dentre as principais causas da formação de nitrosaminas como contaminantes em IFA, está o uso simultâneo de aminas secundárias ou terciárias e de agentes nitrosantes, fontes de NOx (NaNO₂, N₂O₃ por exemplo) na síntese ou obtenção de intermediários ou IFAs. Não apenas o uso deliberado desses compostos na mesma etapa pode levar à formação de nitrosaminas, mas, também, o carreamento de aminas ou fontes de NOx de etapas prévias até etapas subsequentes pode gerar uma condição propícia à formação de nitrosaminas. Reagentes, materiais de partida, solventes e catalisadores contaminados podem também levar a formação de nitrosaminas durante etapas sintéticas.

As aminas podem também ser geradas *in situ*. Como exemplo, tem-se o solvente dimetilformamida (DMF) que pode sofrer hidrólise ácida ou básica em condições favoráveis e gerar a dimetilamina (DMA), que é suscetível à nitrosação (Figura 10).

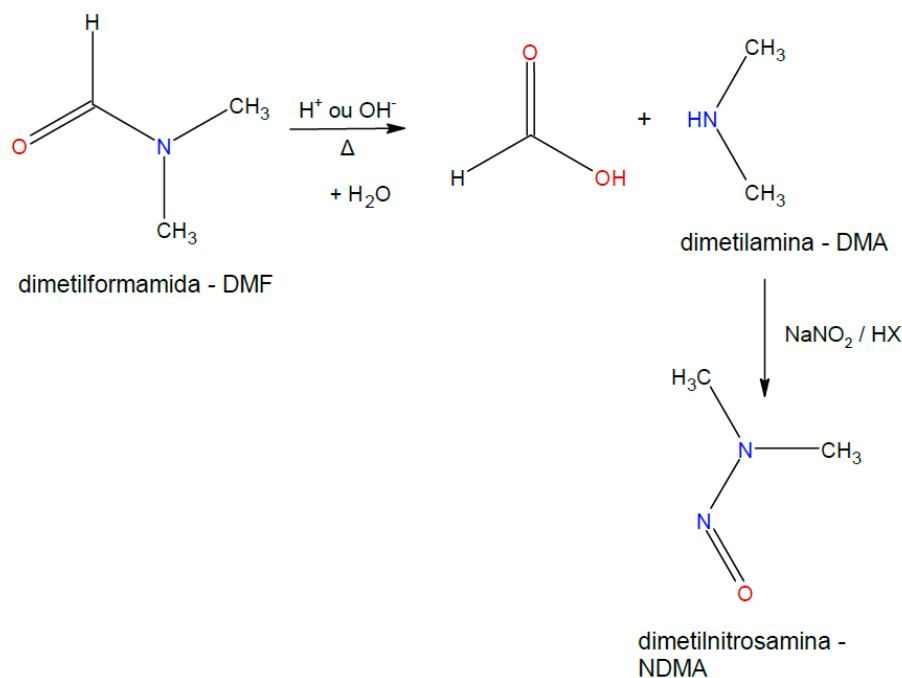


Figura 10- Hidrólise da dimetilformamida (DMF) e formação de NDMA.

A dimetilamina também pode constar como impureza no solvente dimetilformamida (DMF), advinda do próprio processo de síntese da DMF. De forma semelhante, o solvente metilpirrolidona (NMP) pode sofrer hidrólise e gerar substrato passível de nitrosação (Fig. 11) (Klein 2017, EMA 2020).

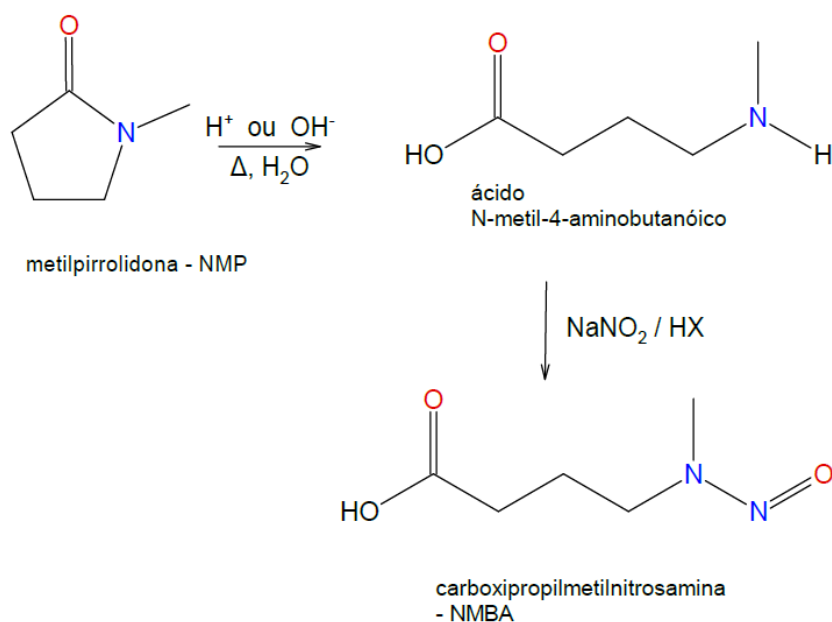


Figura 11- Hidrólise da metilpirrolidona (NMP) e formação de NMBA.

Os casos acima mencionados constituem possíveis causas da presença das nitrosaminas NDMA e NMBA em alguns processos de obtenção de IFAs (EMA 2020), exemplificando como as condições do processo devem ser avaliadas quanto ao potencial de formação de aminas suscetíveis à nitrosação, principalmente quando são empregados agentes capazes de gerar espécies nitrosantes, mesmo que em etapas distintas do processo, já que o carreamento de impurezas de uma etapa à outra pode levar a riscos de formação de

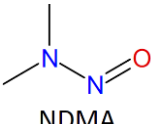
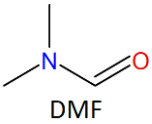
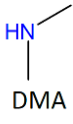
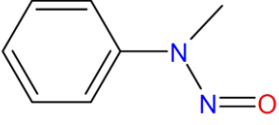
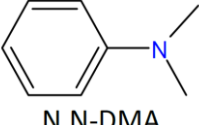
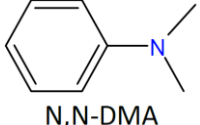
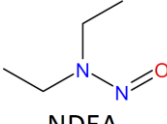
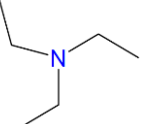
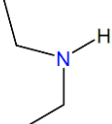
nitrosaminas. Por exemplo, o nitrito utilizado em uma determinada etapa pode ser carregado a etapas subsequentes, passando por processos de *work-up*, cristalização ou por outras operações de purificação efetuadas (EMA 2020, FDA 2020).

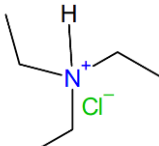
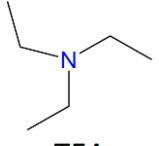
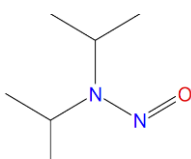
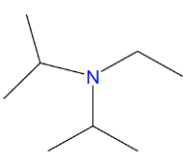
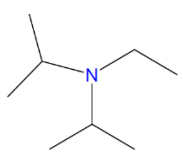
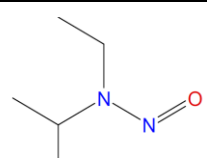
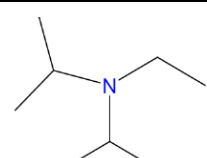
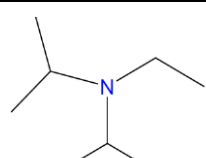
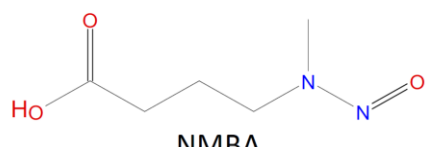
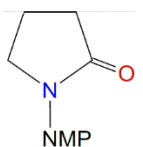
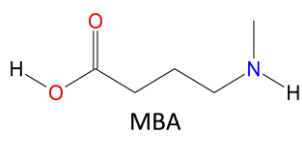
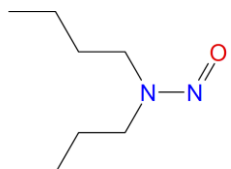
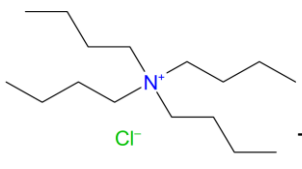
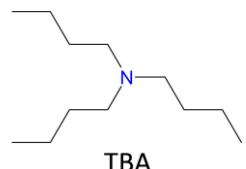
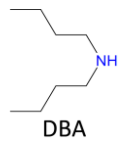
Além das transformações de insumos empregados no processo, exemplificadas com os casos de hidrólise de DMF e NMP, reações diretas entre sais de amônio e agentes nitrosantes também podem ocorrer. Por exemplo, os catalisadores brometo de tetrabutilamônio (TBAB) ou cloridrato de trietilamina (TEA.HCl) sofrem desalquilação nitrosativa, reação semelhante à apresentada na Figura 9. Não obstante, o solvente dimetilacetamida e outras amidas podem seguir o mesmo padrão de degradação mostrado nas Figuras 10 e 11, gerando aminas passíveis de nitrosação. Digno de nota, além dos casos mencionados até aqui, é a possibilidade de oxidação de hidrazinas, o que pode acontecer inclusive através da simples exposição ao oxigênio do ar (López-Rodríguez et al., 2020, Horne et al., 2023).

Devido ao amplo emprego de aminas em diversos processos de síntese, é possível que estas estejam presentes como contaminantes em diversos insumos. Adicionalmente, é possível a presença de aminas menos substituídas em reagentes como aminas terciárias ou sais de amônio. Por exemplo, di-isopropilamina e isopropiletilamina são possíveis contaminantes da di-isopropiletilamina (DIPEA), assim como dietilamina é uma provável impureza presente na trietilamina (TEA). Além disso, catalisadores de transferência de fase como cloridrato de trietilamina (TEA.HCl) foram identificados como potencial fonte de trietilamina e dietilamina (EMA 2020).

É de crucial importância a avaliação do processo de obtenção de um insumo farmacêutico ativo (IFA) por completo, incluindo avaliação da obtenção de intermediários chaves e materiais de partida. A possibilidade de carregamento de um determinado substrato de uma etapa do processo à outra, o uso de reagentes que possuem em seu perfil de contaminantes aminas ou potenciais agentes nitrosantes e as condições do processo, como temperatura e pH que possam favorecer a degradação de reagentes ou solventes, são alguns exemplos importantes a serem observados.

Nesse sentido, é importante o conhecimento do grau de pureza dos materiais introduzidos e suas potenciais impurezas. Contaminações dentro de uma mesma unidade fabril ou advindas de recuperações/reutilizações de solventes ou materiais conduzidos por terceiros devem sempre ser consideradas nas avaliações de risco dos processos de síntese. Possíveis combinações críticas que devem ser observadas são situações em que as condições gerais de formação de nitrosaminas estão presentes como nos exemplos do Quadro 1.

Nitrosamina formada	Fonte de NOx	Fonte de amina	Amina nitrosada
 NDMA	NaNO ₂	 DMF	 DMA
 NMPA	NaNO ₂	 N,N-DMA	 N,N-DMA
 NDEA	NaNO ₂	 TEA	 DEA

		 TEA.HCl	 TEA
 DIPNA	NaNO ₂	 DIPEA	 DIPEA
 EIPNA	NaNO ₂	 DIPEA	 DIPEA
 NMBA	NaNO ₂	 NMP	 MBA
 NDBA	NaNO ₂	 TBAB	 TBA
			 DBA

Quadro 1– Exemplos de combinações críticas que podem levar a formação de nitrosaminas.

Além da nitroação de aminas, também devem ser consideradas, durante a avaliação, outras condições menos clássicas que permitem a formação de nitrosaminas citadas na literatura (López-Rodríguez et al. 2020), como a redução de nitraminas, oxidação de hidrazinas e formação a partir de compostos organometálicos.

b) Formação de nitrosamina como contaminante em processo de fabricação de medicamentos

A formação de nitrosaminas durante a produção de medicamentos é menos previsível em comparação com a produção do IFA. No entanto, as considerações feitas na seção anterior acerca das possíveis vias de formação das nitrosaminas no IFA podem permanecer válidas para o medicamento, desde que as condições reacionais estejam presentes.

A formação de nitrosaminas em medicamentos pode ocorrer em decorrência de alguns fatores ligados ao processo produtivo do medicamento e suas operações unitárias, da interação entre IFA e excipiente durante o processo produtivo ou durante o armazenamento, da degradação do IFA e outros materiais, da interação da formulação com o material de embalagem e, também, por contaminação cruzada entre processos.

No contexto da formação de nitrosaminas no produto acabado, a disponibilidade de agente

nitrosante pode advir das matérias primas utilizadas. Sabe-se que excipientes como crospovidona, hipromelose, estearato de magnésio, dentre outros podem conter nitrito como impurezas (Boetzel et al. 2022). A interação do nitrito dos excipientes deve ser avaliada frente a presença de amins, principalmente secundárias, advinda de outros excipientes, IFA ou substâncias relacionadas do IFA.

Algumas operações unitárias apresentam riscos potenciais para a formação de nitrosaminas, como o processamento em leitos fluidizados, devido à possibilidade de oxidação de hidrazinas dissubstituídas ou exposição de amins secundárias às espécies de nitrogênio oxidado (López-Rodríguez et., 2020) (Horne et al., 2023). A granulação úmida pode facilitar o contato entre o IFA, ou quaisquer substâncias relacionadas com função amina, e os agentes nitrosantes, principalmente se essa etapa do processo ocorrer em uma faixa de pH ideal (Horne et al., 2023). Embora os riscos associados à qualidade da água geralmente sejam considerados baixos, é fundamental controlar adequadamente a qualidade da água e estimar a quantidade de nitrito, ou a própria presença de nitrosaminas na água. A depender das condições, a formação de nitrosaminas pode tornar-se significativa em valores de pH mais baixos (<7) em situações em que os níveis de nitrito estão acima do limite máximo na água potável permitido pela OMS, que é de 3 mg/L (Answorth, 2020).

A degradação da ranitidina, que ocorre no produto acabado e que pode ser influenciada pela morfologia do cristal da molécula, é um exemplo de formação de nitrosaminas que envolve a degradação do IFA e é influenciada por fatores diversos dos classicamente atribuídos a formação de nitrosaminas.

As embalagens já foram associadas a presença de NDMA e a NDEA, devido a reações entre as amins presentes nas tintas de impressão e a nitrocelulose presente nas folhas de vedação das embalagens. Durante o processo de selagem em alta temperatura, as nitrosaminas podem evaporar e contaminar outros produtos farmacêuticos na embalagem.

5. GERENCIAMENTO DE RISCO

Sugere-se que as empresas utilizem os princípios de gerenciamento de risco descritos no Guia ICH Q9(R1) - *Quality Risk Management* (ICH 2023) como suporte na realização das análises de risco. Neste presente guia propomos a realização desta análise em três etapas: Avaliação de Risco (1), Testes Confirmatórios (2) e Controle de Nitrosaminas para Produtos Regularizados (3).

A Etapa 1 denominada Avaliação de Risco consiste na identificação e avaliação do risco de formação e presença de nitrosaminas. Sugere-se que esta etapa seja iniciada pela análise da rota de síntese do IFA, que poderá ser feita pelo fabricante, distribuidor ou fracionador do IFA, detentor do registro do IFA (*holder*) ou ainda pela fabricante do medicamento, caso detenha a rota de síntese completa do ativo. O conhecimento da síntese completa do IFA engloba o conhecimento das rotas de síntese dos materiais de partida, o controle dos materiais e o conhecimento da rota de síntese em detalhes. Essas informações estão comumente nas partes restritas do Dossiê do Insumo Farmacêutico Ativo (DIFA). Após essa avaliação, a empresa prosseguirá com a avaliação do processo produtivo do produto acabado e do potencial de formação de nitrosaminas durante todo o prazo de validade.

Caso seja identificado risco de presença de nitrosaminas como resultado da Etapa 1, a empresa deve prosseguir para a Etapa 2 e realizar os testes confirmatórios, a fim de confirmar ou refutar a presença de nitrosaminas no IFA ou produto acabado, a depender da origem do risco. Nesta etapa, a empresa deve verificar se a nitrosamina identificada e quantificada possui um limite de ingestão aceitável definido e publicado pela Anvisa conforme Anexo I deste guia. Além dos limites apresentados no Anexo I deste guia, caso haja para a nitrosamina em questão, limite harmonizado simultaneamente pela EMA, FDA e Health Canada, tal valor poderá ser adotado pela empresa, desde que presente como nitrosamina única.

Caso a empresa discorde dos limites de nitrosaminas estabelecidos no Anexo I (Limites de aceitação para nitrosaminas) ou a impureza nitrosamina identificada ainda não tenha um limite de ingestão aceitável harmonizado e publicado, deverá comunicar a Anvisa e propor novos limites com base em novas

evidências de segurança por meio de protocolo no sistema Solicita à GESEF (Gerência de Avaliação de Segurança e Eficácia) utilizando o código de assunto 12194 - Avaliação de limite de segurança para nitrosaminas – Empresa.

Para realizar os ensaios, a empresa deverá utilizar procedimentos analíticos adequadamente sensíveis para a quantificação dessas impurezas. Considera-se ausência de nitrosaminas quando estas estiverem abaixo de 10% do limite de ingestão aceitável, porém outras abordagens podem ser justificadas, não excedendo o limite de 30%. Uma vez confirmada a presença de nitrosaminas a partir dos testes realizados na Etapa 2 a empresa deve dar andamento a Etapa 3 onde são definidos os controles de nitrosaminas em seus produtos.

Nas situações em que há identificação da presença de nitrosaminas acima dos limites aceitáveis, a empresa deve adotar as ações de mitigação de risco necessárias e comunicar a Anvisa (Gerência de Inspeção e Fiscalização – GGFIS) por meio do protocolo no sistema Solicita utilizando os seguintes códigos de assunto: 70788 - INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS - Notificação para Avaliação de Nitrosaminas acima dos Limites Aceitáveis (fabricantes, distribuidoras e fracionadoras) (petição empresa) e/ou 70789 - MEDICAMENTOS - Notificação para Avaliação de Nitrosaminas acima dos Limites Aceitáveis (fabricantes e importadoras).

Importante destacar que em todos os casos a empresa é a responsável por garantir a qualidade e segurança de seus produtos com a avaliação do risco da ingestão pelos pacientes e adoção das ações apropriadas para evitar ou minimizar a exposição dos indivíduos às nitrosaminas, inclusive nas situações de discordância com os limites descrito no Anexo I e no período até definição do limite pela Anvisa.

As ações de controle de risco devem incluir as mudanças relacionadas à(s) causa(s) raiz(es) identificada(s) na investigação, bem como avaliação da necessidade de adoção de medidas que restrinjam a disponibilidade do produto no mercado (por exemplo: suspensão de distribuição e comercialização, recolhimento) levando em consideração ações adotadas para mercados em outros países e aspectos como risco de desabastecimento de mercado e disponibilidade de alternativas terapêuticas.

Para impurezas conhecidas acima do limite estipulado no Anexo I – Limites de aceitação do presente Guia as empresas devem imediatamente suspender a distribuição e comercialização dos medicamentos ou IFAs envolvidos, além de avaliar a necessidade de recolhimento que deverão ser tratados conforme disposto nas Resolução RDC nº 677/2022 e nº 625/2022 e suas atualizações.

Por fim, havendo a confirmação de presença de nitrosaminas e, desde que dentro dos limites aceitáveis, a empresa deve protocolar junto à Agência, caso aplicável, as respectivas petições pós-registro em conformidade com a normativa aplicável a cada caso. As inclusões de teste são de implementação imediata ou notificação imediata e realizadas mediante código assunto específico. Para as petições aplicáveis a medicamentos e IFAs sintéticos e semissintéticos, deverão ser utilizados os seguintes códigos de assunto:

- 12195 - GENÉRICO - Inclusão do teste crítico de controle de nitrosaminas no medicamento – RDC 677/2022
- 12198 - GENÉRICO - Inclusão do teste de controle de nitrosaminas no IFA com CADIFA - RDC 677/2022
- 12201 - GENÉRICO - Inclusão do teste de controle de nitrosaminas no IFA sem CADIFA - RDC 677/2022
- 12197 - NOVO - Inclusão do teste crítico de controle de nitrosaminas no medicamento - RDC 677/2022
- 12200 - NOVO - Inclusão do teste de controle de nitrosaminas no IFA com CADIFA - RDC 677/2022
- 12196 - SIMILAR - Inclusão do teste crítico de controle de nitrosaminas no medicamento - RDC 677/2022
- 12199 - SIMILAR - Inclusão do teste de controle de nitrosaminas no IFA com CADIFA - RDC 677/2022
- 12202 - SIMILAR - Inclusão do teste de controle de nitrosaminas no IFA sem CADIFA - RDC 677/2022

Destaca-se que além da inclusão de testes, outras alterações pós-registro podem ser aplicáveis a fim de mitigar o risco da presença de nitrosaminas. Os casos abaixo ilustram alguns exemplos de alteração pós-registro necessárias conforme apontamentos da avaliação de risco:

Exemplo 1: Após a identificação e avaliação de risco do produto X a empresa realizou testes confirmatórios e verificou a presença de NDMA acima do limite aceitável. Segundo a avaliação de risco da empresa, a causa raiz da presença da nitrosamina foi a reação da nitrocelulose, componente da embalagem primária, com uma amina presente em excipientes do produto durante o processo de fechamento do blíster por aquecimento. A fim de realizar a adequação do produto, a empresa propõe como alteração pós-registro uma alteração de embalagem a fim de remover a nitrocelulose como componente do blíster. Para isso, realiza-se o protocolo de uma alteração tipo 7.c (mudança maior de composição de embalagem primária) nos termos da RDC nº 73/2016, a qual requer protocolo individual e deve aguardar manifestação da Anvisa. Considerando a correta avaliação de risco realizada, a alteração permite adequação do produto em relação a presença de nitrosaminas em níveis aceitáveis e não são necessárias alterações pós-registro adicionais ou paralelas.

Exemplo 2: Após a detecção e confirmação da presença de mais de uma nitrosamina atingindo limites não aceitáveis, a detentora do registro, por meio de sua investigação, detecta que a causa raiz envolve o próprio IFA e provavelmente a presença de nitrosamina proveniente de solventes que foram utilizados na rota de síntese. Supondo que o fabricante de IFA aprovado optou por descontinuar o IFA em questão, a requerente decide realizar alteração do fabricante de IFA para adequar o produto. Para esse caso deve ser considerada a condição da presença ou não de CADIFA nos termos da RDC nº 359/2020. Caso o fabricante proposto já tenha CADIFA e sejam também atendidas as condições descritas na alteração 1.g - Substituição de detentor de CADIFA (implementação imediata) do Anexo I da RDC 361/2020, essa mudança poderá ser de implementação imediata. Caso tais condições não sejam atendidas ou o fabricante proposto não possua CADIFA, a mudança deve aguardar deferimento. Nesse caso, tendo em vista que a alteração do fabricante mitiga o risco de nitrosaminas que existia devido ao fabricante aprovado, a avaliação de risco prévia pode justificar a não necessidade de pós-registros paralelos adicionais, podendo ser suficiente realizar apenas a alteração do fabricante do IFA.

Exemplo 3: Conforme exemplo acima, a causa-raiz foi identificada como sendo uma nitrosamina proveniente do processo de fabricação do IFA, porém nesse caso a empresa realizará uma mudança de processo do IFA que eliminará esse risco. Para esse caso deve ser considerada a condição da presença ou não de CADIFA nos termos da RDC nº 359/2020 e se a alteração envolve impacto no perfil de impurezas. Considerando o entendimento do Perguntas e Respostas da RDC 73 Edição 5 (Setembro 2023), de que a retirada de uma impureza não se enquadra em impacto no perfil de impurezas, essa pode ser considerada de implementação imediata nos termos da RDC nº 361/2020 desde que a mudança não impacte de outra forma no perfil de impurezas (ex. gerando outra impureza) ou nas especificações do IFA (ex. mudando sua forma cristalina). Por exemplo, para o caso de mudança de DIFA sem CADIFA, atendendo-se aos requisitos da norma, a alteração pode ser classificada como uma alteração do tipo 1.d (Mudança do DIFA sem CADIFA (implementação imediata)). Nesse caso, assim como no exemplo anterior, não haveria necessidade de pós-registros paralelos adicionais, sendo suficiente realizar apenas a mudança de processo do IFA.

As alterações pós-registro devem ser protocoladas de acordo com a norma vigente, e contendo toda a documentação pertinente. Assim, por exemplo, nos casos em que houver inclusão do teste de controle de nitrosaminas em IFA ou medicamento sintético, a petição será de protocolo individual e implementação imediata, nos termos da RDC 73/2016. Já nos casos em que houver mudança na rota de síntese de IFA sintético para mitigar o risco de formação de nitrosaminas, a mudança pode ser classificada como de análise prévia (a depender das condições no caso concreto), e o fato dela ter como objetivo a mitigação de risco de formação de nitrosaminas não faz com que ela possa ser implementada antes da análise.

Quanto às nitrosaminas que ainda não tenham limite de aceitação definido, não se espera que seja protocolada uma mudança pós-registro de inclusão de teste até que os limites sejam aprovados pela ANVISA. Entretanto, ressalta-se que a empresa detentora do registro deve adotar as medidas de controle necessárias e realizar o teste o mais rapidamente possível após a identificação de sua necessidade.

É importante mencionar que toda documentação relacionada ao gerenciamento de risco de nitrosaminas deve ser arquivada na empresa e a qualquer tempo poderá ser requerida pela Agência ou verificada durante inspeções de Certificação de Boas Práticas de Fabricação (CBPF), inspeções investigativas ou auditorias de registro.

A Figura 12 apresenta síntese das etapas relacionadas a avaliação de risco e as ações necessárias decorrentes do risco identificado.

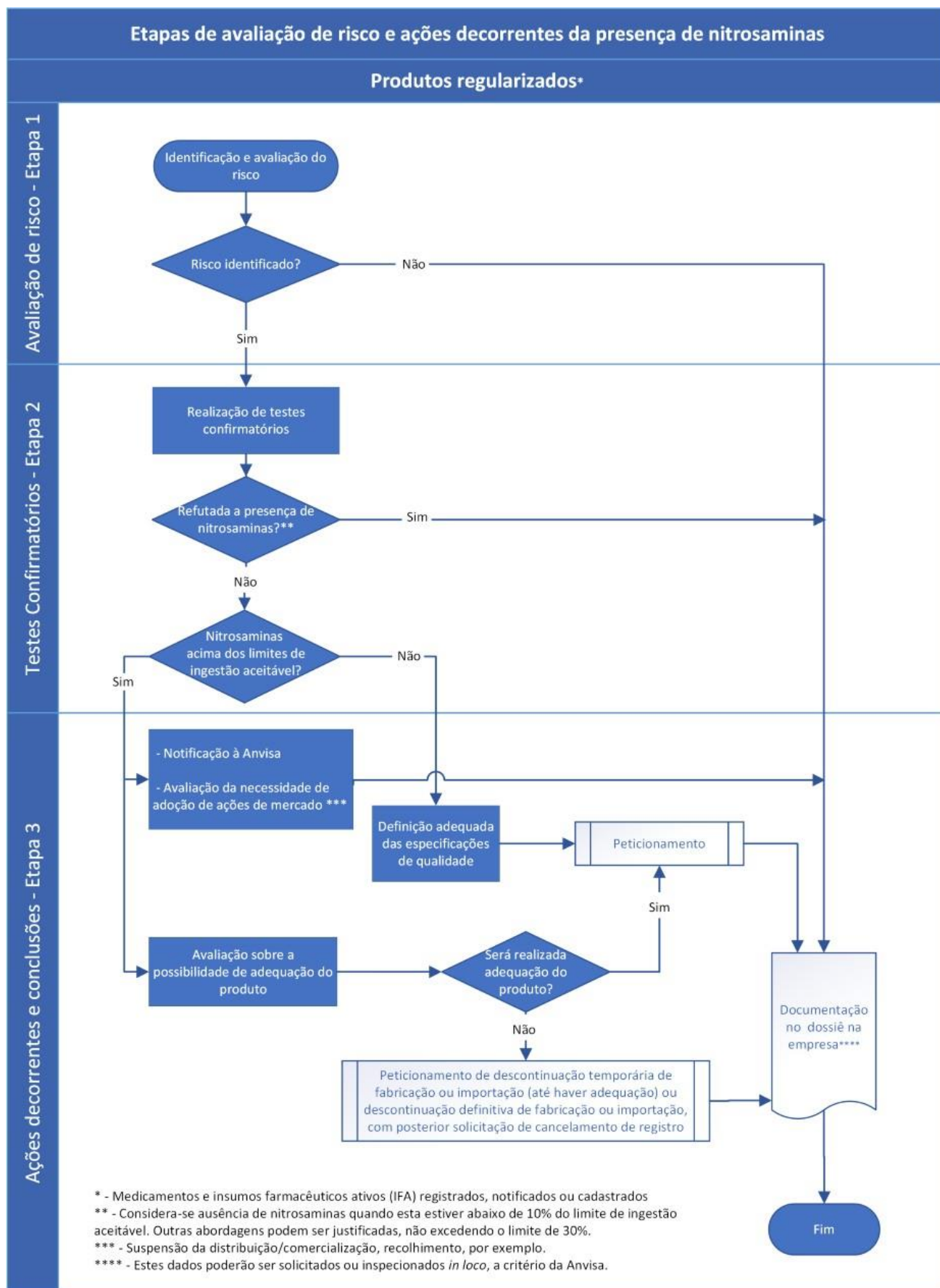


Figura 12 - Etapas relacionadas a avaliação de risco e as ações necessárias decorrentes do risco identificado.

6. FATORES DE PRIORIZAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DE RISCO (ETAPA 1)

Sabe-se que a quantidade de medicamentos registrados por uma empresa pode ser expressiva e, por este motivo, sugere-se que a sequência de avaliação dos produtos seja estabelecida com base no conhecimento prévio sobre eles. As empresas podem considerar fatores como ingestão diária recomendada, duração do tratamento, indicação terapêutica, números de pacientes tratados ou outros que entendam pertinentes de acordo com o portfólio ou com a situação do produto. Por exemplo, a ausência de comercialização de determinado produto ou de determinada condição que esteja aprovada (como um fabricante de IFA alternativo que seja aprovado, mas não seja utilizado pela empresa) podem justificar que esta avaliação não seja priorizada em um primeiro momento. Porém, nos casos em que determinada condição aprovada não foi avaliada quanto ao risco de conter nitrosaminas, pois não estava sendo comercializada, a análise de risco deverá ser realizada antes do reinício da comercialização.

O Quadro 2 apresenta um exemplo de priorização, utilizando os critérios “Duração do tratamento versus Dose Máxima Diária”, o qual foi proposto pelas entidades representativas do Setor Farmacêutico Brasileiro em resposta ao “Painel de Discussão sobre o controle de Nitrosaminas em medicamentos”, realizado no dia 5 de fevereiro de 2020 no Auditório da Anvisa.

Dose Máxima Diária	Duração do tratamento		
	> 1 ano	1 a 12 meses	≤ 1 mês
>1000mg	Muito Alto	Alto	Médio
100mg a 1000mg	Alto	Médio	Baixo
<100mg	Médio	Baixo	Muito Baixo

Quadro 2 - Priorização por Duração de tratamento X Dose Máxima Diária.

Para realizar a avaliação de medicamentos com risco identificado, as empresas também podem utilizar ferramentas como a Análise de Modo de Falha e seus Efeitos (FMEA) e a Análise de Modo de Falha, Efeitos e Criticidade (FMECA), conforme descrito na diretriz do Guia ICH Q9 (R1) - Quality Risk Management (ICH 2023).

a) Componentes básicos

Espera-se que os fabricantes, distribuidoras e fracionadoras de IFAs e empresas fabricantes e importadoras de medicamentos trabalhem em conjunto e realizem as avaliações de risco utilizando os princípios de gerenciamento da qualidade. Ademais, o resultado do trabalho realizado deve ser baseado em conhecimento científico sempre vinculando a proteção do paciente e observando que o nível de esforço, formalidade e detalhamento da documentação seja proporcional ao nível de risco.

Além disso, os princípios descritos no Guia ICH M7(R2) - *Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk* (ICH 2023) em relação à avaliação de mutagenicidade, estratégias de controle e alterações nos processos de fabricação de substâncias ativas podem ser aplicados.

É relevante pontuar que caso o risco de formação de nitrosaminas tenha sido avaliado durante a fase de desenvolvimento dos processos de fabricação de IFA/produto acabado, estas informações poderão ser usadas para fundamentar a avaliação de que trata o presente guia.

Finalmente, ao término da Etapa 1, as empresas devem ter argumentos suficientes para responder aos seguintes questionamentos:

- Qual o risco de formação de nitrosaminas no processo sintético do IFA, levando em consideração a combinação de reagentes, solventes, catalisadores e materiais de partida usados, intermediários

formados, impurezas e degradantes?

- Qual o risco de contaminação por nitrosaminas (por exemplo, de materiais recuperados, como solventes, reagentes e catalisadores, equipamentos, materiais de partida ou intermediários)?
- Qual o risco de formação de nitrosaminas durante a fabricação do produto acabado ou durante o armazenamento ao longo da sua vida útil (por exemplo, possível degradação ou interação com excipientes e material de embalagem)?

b) Avaliação de purga

Caso seja verificada a presença de risco potencial de formação de nitrosaminas no processo sintético do IFA, levando em consideração os reagentes, solventes, catalisadores, materiais de partida, intermediários formados e outras impurezas, pode ser realizada uma avaliação pormenorizada de todo o processo de obtenção do fármaco no que tange às possibilidades de eliminação/purga da(s) nitrosamina(s) potencialmente presente(s).

Nessa análise, caso o domínio do processo de obtenção do IFA, e seus parâmetros associados, seja tal que permita determinar que o risco da presença da(s) nitrosamina(s) acima do(s) limite(s) máximo(s) permitido(s) seja negligenciável, a estratégia de controle poderá ser baseada apenas no controle do processo, não sendo necessários testes analíticos. Essa estratégia é análoga a opção 4 do Guia ICH M7.

Para que tal estratégia de controle seja aceitável, é necessária uma análise de risco formal, considerando as propriedades físico-químicas da(s) nitrosamina(s) em questão e os fatores do processo de obtenção do IFA que impactam no destino e na eliminação/purga da(s) nitrosaminas, incluindo reatividade química, solubilidade, volatilidade, ionizabilidade e processos especificamente desenvolvidos para remoção da(s) nitrosamina(s) em questão. É crucial que fique claramente registrado, e prontamente disponível à Anvisa, todos os fatores considerados pela empresa e que subsidiaram a estimativa de eliminação em cada etapa do processo. Esse tipo de análise deve ser necessariamente conduzido por pessoal qualificado que detenha o conhecimento do processo de obtenção do IFA, a fim de evitar estimativas de purga erradas em virtude da falta de conhecimento do processo específico ou aplicação errônea dos fatores de eliminação e demais conceitos aplicáveis e descritos em literatura. O resultado da análise de risco deve estimar um fator de eliminação/purga da(s) nitrosaminas contaminante(s) em questão.

Estudos de contaminação/eliminação poderão ser empregados como forma de evidência da capacidade do processo em eliminar/purgar a(s) nitrosamina(s) em questão. Quando não for possível determinar a ausência, ou a presença em níveis negligenciáveis, a partir da análise de risco/fator de purga estimado, a estratégia de controle deverá incluir testes analíticos no IFA ou em intermediários isolados.

Algumas publicações científicas estão disponíveis e podem ser consultadas para orientar quanto às melhores práticas de cálculo do fator de purga, estabelecendo requisitos necessários para justificar a eliminação da impureza, inclusive para casos envolvendo nitrosaminas, e podem ser utilizadas como referência nessa etapa, por exemplo: Teasdale et al. 2010, Teasdale et al. 2013, Barber et al. 2017, Burns et al. 2019, Burns et al. 2020.

7. TESTES CONFIRMATÓRIOS (ETAPA 2)

a) Método analítico

Assim como para outras impurezas, a avaliação laboratorial da presença de nitrosaminas requer a aplicação de procedimentos analíticos sensíveis e seletivos, sendo muitas vezes necessária a associação de diferentes técnicas analíticas como de separação cromatográfica associadas à identificação e quantificação por espectrometria de massas, por exemplo.

Embora a Farmacopeia Brasileira ainda não disponha de método de análise de nitrosaminas, vários procedimentos têm sido desenvolvidos e tornados públicos inclusive por autoridades regulatórias como a Agência Europeia de Medicamentos – EMA (EDQM 2020), Agência Americana de Medicamentos e Alimentos - FDA (FDA 2019) e Agência Canadense de Medicamentos - Health Canada (Health Canada 2019).

Há que se considerar também as farmacopeias estrangeiras admitidas no Brasil, conforme a Resolução RDC nº 511, de 27 de maio de 2021 ou suas atualizações. Estes métodos, caso disponíveis, podem ser utilizados pelas empresas como base para a análise de seus produtos.

Considerando os aspectos relacionados à formação destes contaminantes e o catálogo de produtos da empresa, uma estratégia a se considerar é o desenvolvimento pela empresa de método geral e abrangente que possa ser adequado tanto para análise de insumos ativos, excipientes, como dos produtos acabados em seus diferentes estágios (produção, estudos de estabilidade e outros). Porém, tendo em vista a especificidade de cada produto e os diferentes tipos de matriz, um único método para todos os casos pode não ser possível.

Ressalta-se que, independentemente da estratégia adotada e das adequações realizadas, o método de uso deve atender aos critérios estabelecidos na legislação vigente, a Resolução RDC nº 166, de 24 de julho de 2017, que dispõe sobre validação de métodos analíticos, ou suas atualizações, ou o Guia ICH Q2(R2) (2023) Validação de Procedimentos Analíticos. Neste sentido, destaca-se, mas não se restringe, a necessidade de se observar os limites de detecção ou quantificação e de seletividade, principalmente quando este for aplicável a diferentes matrizes de análise. Importante destacar que a validação analítica deve ser planejada considerando os dados disponíveis para o produto. Com isso se poderá concluir pela possibilidade de utilização de validação parcial, ensaio limite, ou mesmo a necessidade de execução de testes adicionais, entre outras situações.

Há relatos de formação de nitrosaminas inclusive nas etapas de preparação de amostras bem como de interferência na análise por solventes comumente utilizados na rotina laboratorial. Portanto, a preparação adequada da amostra é uma etapa crítica na avaliação destes analitos, seja em razão da perda de impurezas ou da geração dessas durante essa etapa (EMA 2020, King et al. 2020).

b) Lotes a serem tratados

A etapa em que a nitrosamina será testada (intermediário, IFA ou produto acabado) depende da origem da impureza. Por exemplo, quando for necessário o teste confirmatório para impurezas provenientes do processo de fabricação do IFA, estas podem ser testadas no IFA ou em um intermediário do processo, caso sua origem seja anterior a esse intermediário. Já se a impureza for de degradação, recomenda-se que os testes sejam realizados em amostras que representem o produto durante sua validade, por exemplo, lotes submetidos aos estudos de estabilidade, amostras próximas ao vencimento, dentre outras. Nesse caso, o teste se faz aplicável tanto no IFA como no produto acabado.

Os ensaios de quantificação dos lotes de IFA feitos pelo fabricante do IFA poderão ser utilizados pelo detentor do registro do medicamento desde que haja uma avaliação crítica dos resultados, e que o fabricante tenha sido qualificado conforme legislação de Boas Práticas de Fabricação vigente. No entanto, isso não exige a necessidade de avaliação do risco no produto acabado, visto que a formação do contaminante pode

ocorrer em diversas etapas do processo de produção.

Em relação ao número de lotes que serão testados, este deve ser definido pela avaliação de risco da empresa, conforme recomendações abaixo:

- Para medicamentos registrados, devem ser apropriadamente amostrados e testados, no mínimo, 10 % dos lotes anuais, ou 3 lotes por ano, o que for maior.
 - Se menos de 3 lotes forem produzidos no ano, todos os lotes fabricados devem ser testados.
 - Se mais de um fabricante, processo de fabricação e/ou fontes de materiais relacionados ao risco forem utilizados, mais lotes devem ser testados a fim de cobrir todos os fatores de risco.
 - Quando a(s) nitrosamina(s) for(em) impureza(s) de degradação, minimamente 3 lotes representativos do produto durante todo seu prazo de validade devem ser testados.
 - Outras abordagens tecnicamente justificadas poderão ser aceitas.
- Para novo registro ou petição pós-registro, o o número de lotes testados deve ser condizente com a quantidade requerida pela RDC vigente.
 - Além disso, devem ser observados também o quantitativo de lotes requerido no parágrafo anterior. Por exemplo, para petições que solicitam menos de três lotes, a implementação será condicionada ao compromisso da empresa em testar os lotes de implementação também posteriormente, a fim de completar os 3 lotes necessários. Esses dados devem estar disponíveis para apresentação à Anvisa, quando solicitado ou durante inspeção.
- Quando o fabricante do medicamento necessitar realizar a análise do IFA, o número de lotes deve ser definido pela avaliação de risco da empresa.

8. ESTRATÉGIA DE CÁLCULO PARA ATRIBUIÇÃO DE LIMITES DE ACEITAÇÃO

Os compostos *N*-nitrosos são agentes genotóxicos carcinogênicos do grupo denominado “Grupo de Preocupação” ou Cohort of Concern. Trata-se de impurezas mais potentes que a maioria dos demais compostos mutagênicos, portanto, o uso do limite baseado no conceito por “Limiar de Preocupação Toxicológica” ou TTC (*Threshold of Toxicological Concern*) estabelecido no Guia ICH M7(R2) de 1,5µg/dia não é aplicável .

Conforme descrito no Guia ICH M7(R2), para tais compostos espera-se que a ingestão aceitável seja significativamente menor do que para as demais impurezas potencialmente mutagênicas, de forma que o estabelecimento do limite deve idealmente ser feito caso-a-caso, utilizando, por exemplo, dados de carcinogenicidade de compostos estruturalmente semelhantes.

No ano de 2023, foram desenvolvidas e implementadas estratégias que auxiliam a avaliação de segurança de nitrosaminas, sendo estas amplamente divulgadas por outras Agências, e que são aceitas pela Anvisa.

A abordagem de categorização da potência carcinogênica (CPCA, do inglês *Carcinogenic Potency Categorization Approach*) consiste em um modelo desenvolvido a partir de banco de dados de *N*-nitrosaminas e de princípios de relação estrutura-atividade (SAR) e é uma ferramenta adotada pela Anvisa para a derivação de limite para *N*-nitrosamina, sendo o AI (*acceptable intake*) adequado quando se tratar de nitrosamina única. Para compostos que não possuem dados específicos de carcinogenicidade, trata-se de uma abordagem conservadora e que representa a melhor evidência disponível no momento, podendo ser refinada à medida que mais dados foram disponibilizados (Anexo II). O detalhamento do desenvolvimento da ferramenta pode ser consultado em Kruhlak et al. (2024).

O teste de Ames otimizado (EAT, do inglês *Enhanced Ames Test*) define condições para tornar o

teste de Ames descrito no guia 471 da OECD mais sensível para classificar *N*-nitrosaminas como positivas para mutagenicidade. As condições foram definidas baseadas na publicação de autoria de Li et al. (2023). O resultado negativo para mutagenicidade do teste de Ames otimizado implica em AI de 1500 ng/dia para a nitrosamina testada quando se tratar de nitrosamina única (Anexo III).

As abordagens de avaliação do risco descritas no presente Guia se aplicam para todas as vias de administração, e correções de limites para diferentes vias de administração não são aplicáveis. Os casos em que dados científicos justificarem particularidades de uma via de administração específica devem ser avaliados individualmente.

Para produtos destinados ao câncer avançado apenas conforme definido no escopo da diretriz ICH S9 (2009), as impurezas *N*-nitrosaminas devem ser controladas de acordo com as diretrizes ICH Q3A (R2) e ICH Q3B (R2). Se a própria substância ativa for mutagênica ou clastogênica em concentrações terapêuticas, as impurezas *N*-nitrosaminas devem ser controladas em limites para impurezas não mutagênicas de acordo com o guia ICH M7(R2).

Quando determinada nitrosamina resultar em negativo no teste de mutagenicidade *in vivo* (*Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assay*, guia 488 da OECD), os limites de controle dos guias ICH Q3A(R2) e ICH Q3B(R2) podem ser aplicados, após manifestação da GESEF.

A determinação dos limites aceitáveis ou AI (*acceptable intake*) das nitrosaminas listadas nesse guia foi embasada na orientação de cálculo específico para cada composto disposta no Guia ICH M7(R2) e harmonizada com os limites já aceitos por outras autoridades regulatórias (EMA 2020b, EMA 2023, FDA 2020), os quais, por sua vez foram obtidos a partir de estudos de carcinogenicidade em animais, de racional subsidiado por similaridade estrutural, por CPCA ou por testes de mutagenicidade. Os limites para algumas nitrosaminas conhecidas são descritos no Anexo I.

a) Limites para nitrosamina única

A determinação dos limites aceitáveis ou AI (*Acceptable Intake*) das nitrosaminas listadas nesse guia foi embasada na orientação de cálculo específico para cada composto disposta no Guia ICH M7(R2) e harmonizada com os limites já aceitos por outras autoridades regulatórias (EMA 2020b, EMA 2023, FDA 2020 e atualizações), os quais, por sua vez foram obtidos a partir de estudos de carcinogenicidade em animais, de racional subsidiado por similaridade estrutural, por CPCA ou por testes de mutagenicidade. Os limites para algumas nitrosaminas conhecidas são descritos no Anexo I.

Esses valores de ingestão aceitável se aplicam para produto acabado contendo apenas uma nitrosamina. O limite determinado para um produto específico em ppm pode ser calculado por meio da razão da ingestão aceitável (em ng) pela Dose Máxima Diária (DMD) do produto (em mg). Por exemplo, considerando a dose máxima diária de metformina de 2.550 mg e o limite de 96 ng para a NDMA, temos 0,038 ppm (96/2.550) como limite diário aceitável.

Os valores de ingestão aceitável previstos nesse guia, especialmente os calculados baseados em relação estrutura-atividade, são limites interinos, considerando as melhores evidências disponíveis no momento da publicação desse guia. Esses limites podem ser alterados no caso de disponibilidade de novas evidências científicas para esses compostos.

Caso a empresa decida propor limites superiores aos apresentados no Anexo I, deverá apresentar as evidências de segurança que subsidie o limite proposto por meio do código de assunto 12194 - Avaliação de limite de segurança para nitrosaminas – Empresa.

b) Mais de uma nitrosamina

Considerando o caso da detecção de mais de uma nitrosamina no mesmo produto, duas alternativas podem ser utilizadas para definir o limite da soma das nitrosaminas:

Opção 1: a soma de todas as nitrosaminas presentes no produto não deve ultrapassar o limite de aceitação referente à nitrosamina mais potente dentre as presentes.

Opção 2: os limites individuais de cada nitrosamina são ajustados para assegurar que o risco total da exposição a elas não ultrapasse o risco negligenciável.

A opção 2 considera uma abordagem baseada em risco para aceitar a presença de múltiplas nitrosaminas, desde que seja demonstrado que o risco final não exceda a razão de 1:100.000, definida no Guia ICH M7(R2) como risco aceitável de câncer. Assim, caso mais de uma nitrosamina precise ser controlada na especificação do IFA ou do produto acabado, deve-se estabelecer um limite para a soma dessas nitrosaminas, o qual deve assegurar a manutenção do risco negligenciável. Um exemplo de cálculo considerando a opção 2 é descrito na Figura 13.

Essas abordagens são apenas aplicáveis caso mais de uma nitrosamina esteja de fato presente e necessite ser controlada na especificação do IFA ou produto acabado. Caso exista a possibilidade teórica da presença de nitrosaminas, mas que tenham sua ausência demonstrada e que não necessitem ser controladas na especificação, o limite para nitrosaminas totais não deve considerar tais impurezas.

Exemplo:

Para um IFA que contém apenas NDEA, o limite aceitável de 26,5 ng/dia corresponde ao risco de 1:100.000. Por outro lado, caso ele contenha apenas NDMA, o limite aceitável de 96 ng/dia corresponde a esse mesmo risco de 1:100.000.

Em outro cenário, para um IFA que contenha ambas as nitrosaminas, caso fossem mantidos os limites originais, o risco corresponderia à soma de ambas, portanto o dobro do risco inicial - maior que o risco negligenciável. Assim, para que o risco seja mantido em 1:100.000, os limites das nitrosaminas devem ser reduzidos em proporções que assegurem um risco final total negligenciável, conforme descrito abaixo:

Caso o limite de cada uma seja reduzido para 50% do valor original (13,25 ng/dia para NDEA e 48 ng/dia para NDMA), cada uma representará 50% do risco inicial, e a soma de ambas equivalerá ao risco negligenciável (1:100.000). Alternativamente, proporções variáveis entre os limites individuais estabelecidos para cada nitrosamina podem ser empregadas, por exemplo, 30% do limite de NDEA (7,95ng/dia) e 70% do limite estabelecido para NDMA (67,2 ng/dia), conforme representado na Figura 13.

	Ingestão aceitável		Risco	
 NDEA	26,5 ng/dia 30% da ingestão 7,95 ng/dia	→	1 em 100.000 30% do risco	} Risco total 100% de 1 em 100.000
 NDMA	96 ng/dia 70% da ingestão 67,2 ng/dia	→	1 em 100.000 70% do risco	

Figura 13 - Exemplo de estabelecimento de limites para mais de uma nitrosamina.

c) Nitrosaminas novas

Durante a avaliação de risco ainda há possibilidade de serem encontradas outras nitrosaminas, potenciais ou reais, além das listadas no Anexo I. Frente à ausência de limites específicos, recomenda-se uma abordagem semelhante à realizada previamente para as nitrosaminas com limites listados nesse guia, com a determinação de limite específico baseado em estudos de carcinogenicidade, quando disponíveis. Nos casos em que estudos de carcinogenicidade não estejam disponíveis, recomenda-se a derivação de um limite a partir da abordagem CPCA, preferencialmente. A comparação da relação estrutura-atividade (*Structure Activity Relationship* - SAR) com nitrosaminas conhecidas segue como estratégia válida. A aplicação de um TTC específico para a classe das nitrosaminas também pode ser adotada.

Para a determinação de limite baseado na TD₅₀ de estudos de carcinogenicidade, esses devem atender a critérios de qualidade e robustez como descrito no Guia ICH M7(R2), por exemplo, estudos com múltiplas doses (pelo menos 3 grupos) e 50 animais por dose por sexo. Os estudos utilizados para o fim de determinação do limite serão avaliados caso a caso, ainda que a média harmônica da TD₅₀ esteja apresentada na Carcinogenicity Potency Database (CPDB).

Na ausência de estudos robustos que possam subsidiar esse limite, a abordagem SAR segue válida, desde que haja um análogo adequado para a comparação, e que este composto possua a TD₅₀ cujo limite tenha sido derivado a partir de estudo de carcinogenicidade robusto com a estrutura mais similar ao composto em análise. O uso da abordagem SAR deve ser cientificamente justificado e adequadamente documentado.

Por fim, como alternativa à derivação de um limite baseado em SAR, o TTC específico para a classe das nitrosaminas pode ser aplicado. Com base no conhecimento científico e nos dados disponíveis até o momento, o TTC para a classe das nitrosaminas corresponde a 18 ng/dia. Esse valor corresponde ao 5º percentil dos valores de TD₅₀ para 45 nitrosaminas disponíveis na base de dados sobre carcinogenicidade LCDB (do inglês: *Lhasa Limited Carcinogenicity Database*) (LhasaLimited 2020), cuja metodologia para derivação da TD₅₀ foi publicada por Thresher e colaboradores (2019).

Apesar de haver dados de carcinogenicidade para um número maior de nitrosaminas na base de dados *Carcinogenicity Potency Database* - CPDB, de onde se extraíram os dados utilizados para a determinação do TTC geral para carcinógenos genotóxicos (1,5 µg/dia), os valores de TD₅₀ da LCDB foram calculados selecionando apenas estudos que atendiam critérios adicionais de qualidade. Dentre esses critérios estão a remoção de dados para os quais não existe dose-resposta ou as curvas dose-resposta não são lineares, exclusão de estudos com um único grupo e de valores de TD₅₀ acima de 1.000.000 mg/kg (Thresher et al. 2019).

Mais recentemente, Thomas et al. (2021) corroboraram a aplicabilidade de uso da base de dados LCDB considerando apenas estudos mais robustos e da derivação do 5º percentil de modo estatisticamente mais conservador. Os autores discutem que o limite de 18 ng/dia permite considerar um limite de confiança que estime as incertezas e as diferentes potências da classe das nitrosaminas.

A empresa deverá comunicar a Anvisa nos casos de identificação de nova nitrosamina (não contemplada no Anexo I e não listada com o limite harmonizado nas páginas da FDA, EMA e Health Canada, simultaneamente, e apresentar evidência baseada em segurança para definição do seu limite por meio de protocolo no sistema Solicita utilizando o código de assunto 12194 - Avaliação de limite de segurança para nitrosaminas – Empresa.

d) Abordagem *Less Than Lifetime*

O termo “*Less Than Lifetime*” é traduzido livremente para “menos que a vida toda”. Essa abordagem corresponde à possibilidade de se estabelecer limites maiores para impurezas potencialmente mutagênicas quando a duração do tratamento se der por períodos menores do que uma vida toda.

Isso significa que os limites variam conforme a duração do tratamento, baseado em um conceito

fundamental da toxicologia estabelecido pela Lei de Haber:

Concentração x Tempo = Constante

Portanto, o efeito carcinogênico é baseado tanto na dose como na duração da exposição. Esse conceito é estabelecido na Nota 6 do ICH M7 (R2) (ICH 2023). Com base nesse conceito, foram estabelecidos no ICH M7 (R2) (ICH 2023) valores de TTC que variam conforme a duração do tratamento, sendo que aos limites maiores do que os limites definidos para uma vida toda (*lifetime* ou acima de 10 anos) foram ainda incorporados fatores de segurança para mitigar o risco de efeitos agudos que poderiam acontecer, como uma possível saturação das enzimas de reparo do DNA.

No caso das nitrosaminas, o TTC de 1,5 µg/dia não é aplicável devido à sua maior potência, enquadrando-as no grupo de preocupação (*cohort-of-concern*). Porém, o Guia ICH M7(R2) não expressa que seus conceitos, como a abordagem LTL, não sejam aplicadas para os compostos enquadrados nesse grupo.

A aplicabilidade do conceito de LTL para nitrosaminas tem sido discutida internacionalmente, no entanto, ainda não há consenso sobre a segurança de sua utilização como ponto de partida para o cálculo de limites aceitáveis. Desta forma, métodos analíticos devem ser desenvolvidos e validados para que sua sensibilidade (limite de quantificação) seja adequada para as concentrações apresentadas nas situações (a), (b) e (c) do item 8 deste guia e a ausência de nitrosaminas durante os testes confirmatórios, discutida no item 5 desse guia, não deve ser baseada nos limites obtidos através da abordagem LTL. Dada a falta de evidência científica robusta nesse momento, questiona-se a possibilidade de exceder os mecanismos de reparo do DNA, especialmente considerando outras possíveis fontes de nitrosaminas, como polifarmácia, exposição alimentar e ambiental, aumentando consideravelmente o risco de carcinogênese ao aplicar esses fatores para as nitrosaminas (EMA, 2020b).

Dessa forma, a Anvisa recomenda que a abordagem LTL não seja aplicada como ponto de partida para o estabelecimento do limite de segurança de nitrosaminas. Este posicionamento é também adotado por outras Agências, notadamente a EMA (pergunta 10 da revisão 20) (EMA, 2024).

9. GLOSSÁRIO

Análise de risco: processo que consta de três componentes, sendo eles (1) avaliação de risco, (2) gerenciamento de risco e (3) comunicação de risco.

Abordagem *Less than Lifetime*: avaliações estabelecidas para risco de câncer baseadas nas exposições quando essas são menores que a vida toda (70 anos).

***Cohort-of-concern*:** grupo de agentes cancerígenos mutagênicos de alta potência que compreende compostos semelhantes a aflatoxina, N-nitroso- e alquil-azóxicos.

Ingestão aceitável: um nível de ingestão que apresenta risco desprezível de câncer, ou para indicações sérias/ com risco de vida, em que o risco e o benefício são adequadamente equilibrados.

Limiar de preocupação toxicológica, do inglês *Threshold of Toxicological Concern – TTC*: conceito desenvolvido para definir uma ingestão aceitável para qualquer substância química não estudada que represente um risco negligenciável de carcinogenicidade ou outros efeitos tóxicos.

Limite aceitável: concentração máxima aceitável de uma impureza em uma substância medicamentosa ou medicamento, derivada a partir da ingestão aceitável e da dose diária do medicamento.

Material: termo usado para denotar matéria-prima (materiais de partida, reagentes, solventes), materiais auxiliares, intermediários, insumos farmacêuticos ativos e materiais de embalagem e rotulagem.

NDSRIs: Do inglês *Nitrosamine Drug Substance Related Impurities* – referem-se a nitrosaminas complexas ou relacionadas estruturalmente ao IFA.

Produtos regularizados/produtos: medicamentos e insumos farmacêuticos ativos (IFA) registrados, notificados

ou cadastrados.

(Q)SAR e SAR: refere-se à relação entre a (sub)estrutura molecular de um composto e sua atividade mutagênica usando Relações Estrutura-Atividade (Quantitativas) derivadas de dados experimentais.

Risco negligenciável: risco correspondente a uma incidência de câncer de 1 em 100.000.

TD₅₀: Taxa de dose crônica em mg/kg de peso corporal/dia, que causaria tumores em metade dos animais no final de uma vida útil padrão para a espécie, levando em consideração a frequência desse tipo de tumor nos animais de controle.

10. REFERÊNCIAS

Ashworth I W et al. (2020). 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. Org. Process Res. Dev. **24**: 1629–1646.

Barber, C., et al. (2017). "A consortium-driven framework to guide the implementation of ICH M7 Option 4 control strategies." Regulatory Toxicology and Pharmacology **90**: 22-28.

Boetzel, R., et al (2022). A Nitrite Excipient Database: A Useful Tool to Support N-Nitrosamine Risk Assessments for Drug Products. J Pharm Sci. Jun; **112**:1615-1624. doi: 10.1016/j.xphs.2022.04.016. Epub 2022Apr 29. PMID: 35500671.

Burns, M. J., et al. (2019). "New Semi-Automated Computer-Based System for Assessing the Purge of Mutagenic Impurities." Organic Process Research & Development **23**(11): 2470-2481.

Burns, M. J., et al. (2020). "Controlling a Cohort: Use of Mirabilis-Based Purge Calculations to Understand Nitrosamine-Related Risk and Control Strategy Options." Organic Process Research & Development **24**(8): 1531-1535.

Carlson, E. S., et al. (2017). "A General Method for Detecting Nitrosamide Formation in the In Vitro Metabolism of Nitrosamines by Cytochrome P450s." Journal of visualized experiments : JoVE(127): 56312.

EDQM (2020). "Ad-hoc projects of the OMCL Network." 2021. Disponível em: <https://www.edqm.eu/en/ad-hoc-projects-omcl-network>.

EMA (2020)a. Lessons learnt from presence of N-nitrosamine impurities in sartan medicines - Overview and recommendations. EMA/526934/2019, European Medicines Agency.

EMA (2020)b. Nitrosamine impurities in human medicinal products Procedure under Article 5(3) of Regulation EC (No) 726/2004. Procedure number: EMEA/H/A-5(3)/1490, European Medicines Agency.

EMA (2023). "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" EMA/409815/2020 Rev.15. 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

EMA (2024). "Nitrosamines impurities", "Appendix 1: Acceptable intakes established for N-nitrosamines. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/other/appendix-1-acceptable-intakes-established-n-nitrosamines_en.xlsx

Ender, F., et al. (1964). "Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring." Naturwissenschaften **51**(24): 637-638.

EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain)(2023). "Risk assessment of N-nitrosamines in food." EFSA Journal. **21**: 278. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7884>

FDA (2019). "FDA Updates and Press Announcements on Angiotensin II Receptor Blocker (ARB) Recalls (Valsartan, Losartan, and Irbesartan)." 2021. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan#5fdb8ed25acb8>.

FDA (2020)a. "Information about Nitrosamine Impurities in Medications." 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/information-about-nitrosamine-impurities-medications>.

FDA (2020)b. "FDA Requests Removal of All Ranitidine Products (Zantac) from the Market." FDA News Release. Disponível em: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-requests-removal-all-ranitidine-products-zantac-market>.

FDA (2024). "Recommended Acceptable Intake (AI) Limits and Testing Methods.". Disponível em: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/updated-information-recommended-acceptable-intake-limits-nitrosamine-drug-substance-related>

Fong, Y. Y. and W. C. Chan (1973). "Dimethylnitrosamine in chinese marine salt fish." Food and Cosmetics Toxicology **11**(4): 841-845.

Health Canada (2019). "Impurities found in certain angiotensin II receptor blocker (ARB) products, also known as sartans.", Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/compliance-enforcement/information-health-product/drugs/angiotensin-receptor-blocker.html#a4>.

Health Canada (2024). "Nitrosamine impurities in medications: Established acceptable intake limits. Disponível em: <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/compliance-enforcement/information-health-product/drugs/nitrosamine-impurities/established-acceptable-intake-limits.html>

Horne et al., (2023). Regulatory Experiences with Root Causes and Risk Factors for Nitrosamine Impurities in Pharmaceuticals. Journal of Pharmaceutical Sciences **112**: 1166–1182.

IARC (1987). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. **7**: 67. ISBN 978-92-832-1411-3

IARC (2007). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-Nitrosamines. **89**: 553. ISBN 978-92-832-1589-9

ICH (2023). Q2(R2) – Validation of analytical procedures. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE.

ICH (2002). Q3A(R2) – Impurities in new drug substances. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE.

ICH (2003). Q3B (R2) – Impurities in new drug products. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE.

ICH (2023). Q9(R1) - Quality Risk Management. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE.

ICH (2023). M7(R2) - Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk, INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE.

ICH (2009). S9 – Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE.

King, F. J., et al. (2020). "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 **24**(12): 2915-2926.

Klein, D. R. (2017). Preparation and Reactions of Amides Organic Chemistry: 933.

Kruhlik, N.L., et al. (2024). "Determining Recommended Acceptable Intake Limits for N-Nitrosamine Impurities in Pharmaceuticals: Development and Application of the Carcinogenic Potency Categorization Approach (CPCA). Regulatory Toxicology and Pharmacology, *in press*. DOI: 10.1016/j.yrtph.2024.105640.

Li, Y.; Hecht, S. S. (2022a). "Metabolic Activation and DNA Interactions of Carcinogenic N-Nitrosamines to Which Humans Are Commonly Exposed". International Journal of Molecular Sciences 2022, **23** (9), 4559.

Li X, et al (2023). Revisiting the mutagenicity and genotoxicity of N-nitroso propranolol in bacterial and human in vitro assays. Regulatory Toxicology and Pharmacology 2023 **141**, doi: 10.1016/j.yrtph.2023.105410.

LhasaLimited (2020). "Lhasa Carcinogenicity Database." Disponível em: <https://carcdb.lhasalimited.org/carcdb-frontend/#>.

López-Rodríguez, R., et al. (2020). "Pathways for N-Nitroso Compound Formation: Secondary Amines and Beyond." Organic Process Research & Development **24**(9): 1558-1585.

Magee, P. N. and J. M. Barnes (1956). "The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine." Br J Cancer **10**(1): 114-122.

OECD (2020), Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>.

OECD (2022), Test No. 488: Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264203907-en>.

Preussmann, R and Stewart, B.W. (1984). "N-Nitroso Carcinogens. In Chemical Carcinogens, 2nd ed.; ACS Monograph 182; Searle, C.E., Ed.; American Chemical Society: Washington, DC, USA" **2**: 643–828.

Rath, S. and L. S. Canaes (2009). "Contaminação de produtos de higiene e cosméticos por n-nitrosaminas." Química Nova **32**: 2159-2168.

Reusch, W. (1999). "Virtual Textbook of Organic Chemistry." Retrieved 23/09/2020 2020 from <https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/VirtTxtJml/amine2.htm#amin7>.

Roberts, J. D. and M. C. Caserio (1977). Organonitrogen compounds; I. Amines. Basic Principles of Organic Chemistry. Menlo Park, CA, W. A. Benjamin, Inc.: 1095-1166.

Teasdale, A., et al. (2013). "Risk Assessment of Genotoxic Impurities in New Chemical Entities: Strategies To Demonstrate Control." Organic Process Research & Development **17**(2): 221-230.

Teasdale, A., et al. (2010). "A Tool for the Semiquantitative Assessment of Potentially Genotoxic Impurity (PGI) Carryover into API Using Physicochemical Parameters and Process Conditions." Organic Process Research & Development **14**(4): 943-945.

Thomas, R., et al. (2021). "Utilisation of parametric methods to improve percentile-based estimates for the carcinogenic potency of nitrosamines." Regulatory Toxicology and Pharmacology: 104875.

Thresher, A., et al. (2019). "Generation of TD(50) values for carcinogenicity study data." Toxicol Res (Camb) **8**(5): 696-703.

Thresher, A. et al. (2020) Are all nitrosamines concerning? A review of mutagenicity and carcinogenicity data. Regul Toxicol Pharmacol, **116**: 104749

ANEXO I: Limites de aceitação para nitrosaminas

Esses valores de ingestão aceitável se aplicam para IFA ou produto acabado contendo apenas uma nitrosamina.

Nitrosamina (sigla)	Nomenclatura	CAS	Ingestão aceitável (ng/dia)
NDMA	dimetilnitrosamina	62-75-9	96,0 ¹
NDEA	dietilnitrosamina	55-18-5	26,5 ¹
NMPA	fenilmetilnitrosamina	614-00-6	34,3 ¹
NPIP	nitrosaminapiperidina	100-75-4	1.300 ¹
NTHP	nitrosaminatetrahidropiridina	55556-92-8	37 ¹
NMPEA	metilfeniletilnitrosamina	13256-11-6	8 ¹
NTHP	nitrosaminatetrahidropiridina	55556-92-8	37 ¹
NDBA	dibutilnitrosamina	924-16-3	26,5 ²
NDPA	dipropilnitrosamina	621-64-7	26,5 ²
NMOR	nitrosomorfolina	59-89-2	127,0 ³
NNK	butanonapiridinilmetilnitrosamina	64091-91-4	100 ³
NDELA	dietanolaminanitrosamina	1116-54-7	1.900 ³
NPYR	nitrosaminapirrolidina	930-55-2	1.700 ³
Y101	nitrosaminaoctaidrociclopentapirrol	54786-86-6	1700 ⁴
NMPH	metilfenidatonitrosamina	55557-03-4	1.300 ⁵
-	nitrosaminaparoxetina	2361294-43-9	1.300 ⁵
NDLX	duloxetinanitrosamina	2680527-91-5	100 ⁶
-	fluoxetinanitrosamina	150494-06-7	100 ⁶
NNORT	nitrosaminanortriptilina	55855-42-0	8 ⁷
NDPh	difenilaminanitrosamina	86-30-6	78.000 ⁸
-	ácido mefenamiconitrosamina	2114-63-8	78.000 ⁹
EIPNA	etilisopropilnitrosamina	16339-04-1	400 ¹⁰
DIPNA	di-isopropilnitrosamina	601-77-4	1500 ¹⁰
NMBA	carboxipropilmetilnitrosamina	61445-55-4	1500 ¹⁰
MeNP	metilnitrosopiperazina	16339-07-4	400 ¹⁰
NNV	nitrosovareniclina	2755871-02-2-	400 ¹⁰
NTPP	trifluormetiltetrahidrotriazolnitrosopirazina	2892260-32-9	100 ¹⁰
-	nitrosaminarasagilina	2470278-90-9	100 ¹⁰
-	pramipexolnitrosamina	-	400 ¹⁰
-	diclofenaconitrosamina	66505-80-4	1500 ¹⁰
NNEB	nebivololnitrosamina	1391051-68-5	1500 ¹⁰
NBP	bisoprololnitrosamina	2820170-76-9	1500 ¹⁰
-	ciprofloxacinaonitrosamina	864443-44-7	1500 ¹⁰
-	moxifloxacinaonitrosamina	-	1500 ¹⁰
-	atenololnitrosamina	134720-04-0	1500 ¹⁰
-	betaistinanitrosamina	32635-81-7	18 ¹⁰
-	vildagliptinanitrosamina	-	1500 ¹⁰
-	desloratadinanitrosamina	1246819-22-6	400 ¹⁰
-	fenilefrinanitrosamina	78658-64-7	100 ¹⁰
-	buproprionanitrosamina	2763780-10-3	1500 ¹⁰
-	bumetanidanitrosamina	2490432-02-3	1500 ¹⁰

Nitrosamina (sigla)	Nomenclatura	CAS	Ingestão aceitável (ng/dia)
NHCTZ	hidroclorotiazidanitrosamina	63779-86-2	11
-	azitromicinanitrosamina	-	11
-	desmetilazitromicinanitrosamina	-	11
NDAB	dabigatrananitrosamina	2892260-29-4	1500 ¹²

Quadro 1 - Limites de aceitação para nitrosaminas quando presentes como nitrosamina única

¹ Limite calculado a partir do TD₅₀ obtido pela média harmônica dos estudos de carcinogenicidade listado na base de dados *Carcinogenicity Potency Database* (CPDB) disponível em <https://files.toxplanet.com/cpdb/index.html>

² Limite estabelecido com base em estratégia de relação estrutura-atividade SAR com NDEA.

³ Limite baseado no valor de TD₅₀ mais sensível derivado do estudo de TD₅₀ mais robusto disponível na base de dados CPDB ou LCDB

⁴ Limite derivado utilizando SAR e abordagem *read-across* tendo o valor de TD₅₀ de NPYR como ponto de partida

⁵ Limite derivado utilizando SAR e abordagem *read-across* tendo o valor de TD₅₀ de NPIP como ponto de partida

⁶ Limite derivado utilizando SAR e abordagem *read-across* tendo o valor de TD₅₀ de NNK como ponto de partida

⁷ Limite derivado utilizando SAR e abordagem *read-across* tendo o valor de TD₅₀ de NMPEA como ponto de partida

⁸ Limite baseado no valor de TD₅₀ mais sensível derivado do estudo de TD₅₀ mais robusto disponível na base de dados CPDB com aplicação do intervalo de confiança inferior ((% CI) do TD₅₀ estimado (TD₅₀L01))

⁹ Limite derivado utilizando SAR e abordagem *read-across* tendo o valor de TD₅₀ de NDPh como ponto de partida

¹⁰ Limite derivado utilizando CPCA

¹¹ Tratada como não mutagênica e controlada de acordo com os guias ICH Q3A(R2)/Q3B(R2)

¹² Limite baseado em teste de Ames negativo

ANEXO II: Abordagem de Categorização de Potência Carcinogênica para *N*-nitrosaminas - CPCA

Este documento descreve uma abordagem para atribuir a uma impureza *N*-nitrosamina (incluindo nitrosaminas relacionadas estruturalmente ao insumo farmacêutico ativo (IFA), do inglês: *nitrosamine drug substance-related impurities* [NDSRIs]), uma categoria de potência carcinogênica prevista, com um limite de ingestão aceitável (AI, do inglês *acceptable intake*) correspondente, com base em uma avaliação de características estruturais ativadoras ou desativadoras presentes na molécula. No contexto deste documento, características ativadoras ou desativadoras são definidas como subestruturas moleculares associadas a um aumento ou diminuição, respectivamente, na potência carcinogênica.

Este documento está harmonizado com a *Carcinogenic Potency Categorization Approach* (CPCA) adotada por outras agências, como a [EMA](#), [FDA](#), [Health Canada](#).

A Abordagem de Categorização da Potência Carcinogênica (CPCA) é baseada em conceitos de relação estrutura-atividade (SAR) descritos em publicações científicas recentes para compostos de *N*-nitrosamina¹ e também usa um conjunto de *N*-nitrosaminas com valores TD₅₀ obtidos de estudos em ratos da *Carcinogenic Potency Database* (CPDB) e/ou da *Lhasa Carcinogenicity Database* (LCDB)², classificações de potência relativa conforme definido por Rao et al. (1979)³. A abordagem pressupõe que o mecanismo de α -hidroxilação de ativação metabólica⁴ é responsável pela resposta mutagênica e carcinogênica altamente potente observada em muitas *N*-nitrosaminas. Espera-se que características estruturais que aumentem ou diminuam diretamente a favorabilidade do mecanismo de ativação - ou que aumentem a depuração da *N*-nitrosamina por outras vias biológicas - devam ter um efeito correspondente na potência carcinogênica. Portanto, uma previsão do potencial mutagênico e da potência carcinogênica de uma *N*-nitrosamina pode ser gerada com base em suas características estruturais.

Reconhece-se que a ciência está evoluindo na previsão do potencial mutagênico e da potência carcinogênica com base em conceitos de relação estrutura-atividade (SAR). Portanto, a Abordagem de Categorização da Potência Carcinogênica prevista descrita neste documento é uma abordagem conservadora que representa a melhor ciência disponível no momento e espera-se que seja ainda mais refinada e expandida à medida que novos dados estiverem disponíveis. Isso pode incluir o aprimoramento dos limites de AI associados às categorias de potência carcinogênica previstas e alterações nas características estruturais e suas pontuações de características ativadoras e desativadoras associadas.

A Abordagem de Categorização da Potência Carcinogênica se aplica a *N*-nitrosaminas com um átomo de carbono em ambos os lados do grupo *N*-nitroso e onde o carbono não está diretamente ligado duplamente a um heteroátomo (ou seja, *N*-nitrosamidas, *N*-nitrosoureas, *N*-nitrosoguanidinas e outras estruturas relacionadas estão excluídas). Além disso, a abordagem de categorização de potência não se aplica a *N*-nitrosaminas onde o grupo *N*-nitroso está ligado a um nitrogênio dentro de um anel heteroaromático (por exemplo, indol nitrosado). Para *N*-nitrosaminas contendo dois grupos *N*-nitroso, o grupo com a maior potência carcinogênica prevista (ou seja, o grupo com a categoria de potência numérica mais baixa) define o limite AI

¹ Por exemplo, consulte Cross KP and Ponting DJ, 2021. Developing Structure-Activity Relationships for *N*-Nitrosamine Activity, *Comput Toxicol*, 20:100186; Thomas R, Tennant RE, Oliveira AAF, and Ponting DJ, 2022. What Makes a Potent Nitrosamine? Statistical Validation of Expert-Derived Structure-Activity Relationships, *Chem Res Toxicol*, 35:1997–2013; e Ponting DJ, Dobo KL, Kenyon MO, and Kalgutkar AS, 2022. Strategies for Assessing Acceptable Intakes for Novel *N*-Nitrosamines Derived From Active Pharmaceutical Ingredients, *J Med Chem*, 65:15584–15607.

² Consulte Lhasa Carcinogenicity Database, em <https://carcdb.lhasalimited.org/>.

³ Rao TK, Young JA, Lijinsky W and Epler JL, 1979. Mutagenicity of Aliphatic Nitrosamines in *Salmonella typhimurium*, *Mutat Res*, 66:1-7.

⁴ Li Y, Hecht SS, 2022. Metabolic Activation and DNA Interactions of Carcinogenic *N*-Nitrosamines to Which Humans Are Commonly Exposed, *Int J Mol Sci*, 23:4559.

para a molécula inteira⁵. Os carbonos α e β são definidos em relação ao grupo *N*-nitroso, conforme ilustrado na Figura 1.

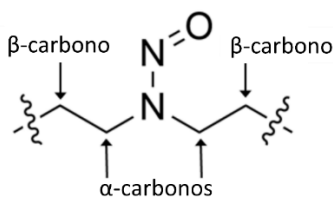
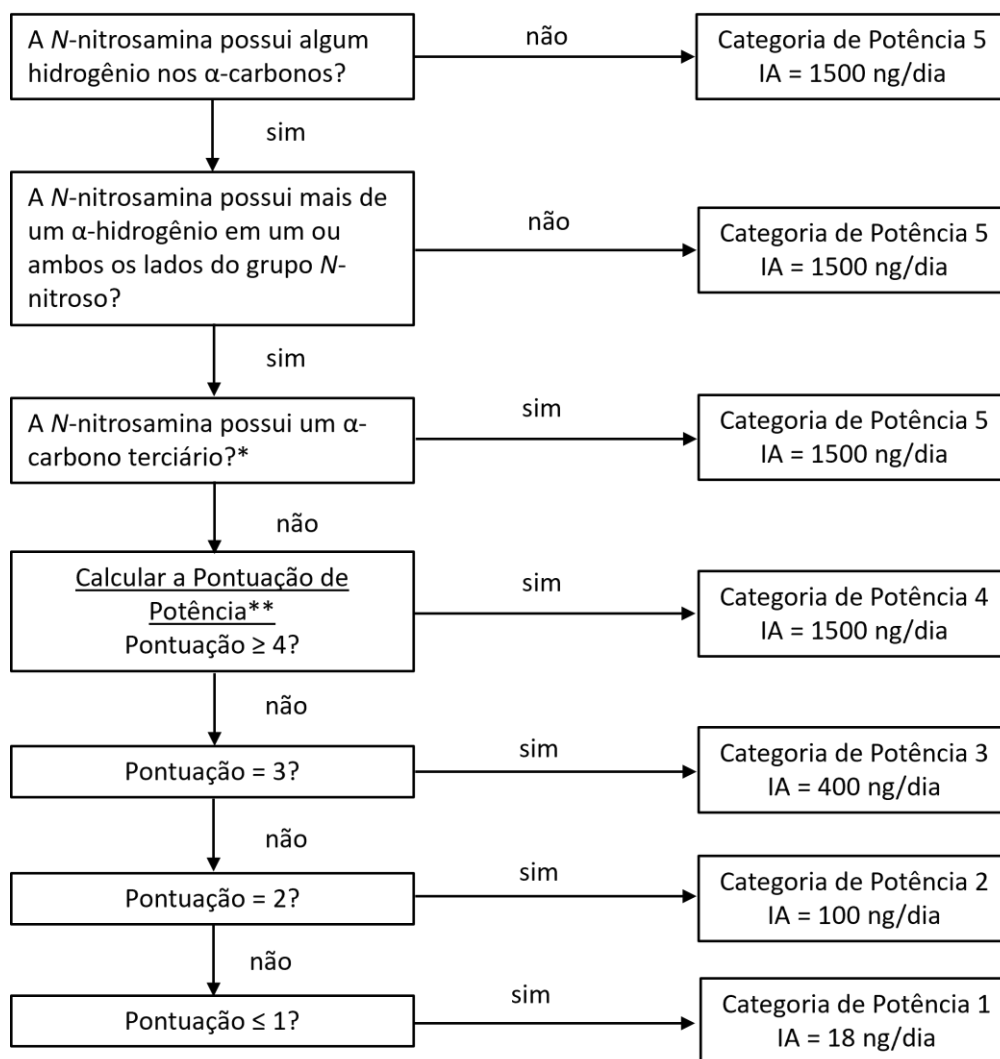


Figura 1 - Representação estrutural de carbonos α e β em uma *N*-nitrosamina.

O processo para prever a categoria adequada de potência carcinogênica é descrito na Figura 2. O Quadro 1 resume as cinco categorias previstas de potência carcinogênica e seus respectivos limites AI associados. Quadros de apoio para calcular a Pontuação de Potência referenciada na Figura 2 estão adiante neste Anexo II.



* Um α -carbono terciário é definido como um átomo de carbono α em um estado de hibridização sp^3 , ligado a outros três átomos de carbono.

** Para calcular a Pontuação de Potência, consulte os Quadros 3, 4 e 5.

Figura 2 - Fluxograma para predição da potência carcinogênica e respectivo limite de segurança, conforme Abordagem de Categorização da Potência Carcinogênica para *N*-nitrosaminas.

⁵ Para as *N*-nitrosaminas que contenham mais de dois grupos *N*-nitroso, a requerente deve entrar em contato com a ANVISA para obter orientações adicionais

Categoria de potência	AI recomendado (ng/dia)	Comentários
1	18	O limite recomendado de AI de 18 ng/dia equivale ao TTC específico da classe para impurezas de <i>N</i> -nitrosaminas.* As <i>N</i> -nitrosaminas atribuídas à Categoria 1 são previstas como tendo alto potencial carcinogênico; no entanto, o TTC específico da classe para <i>N</i> -nitrosaminas é considerado suficientemente protetor aos pacientes.
2	100	O limite recomendado de AI de 100 ng/dia é representativo de duas <i>N</i> -nitrosaminas potentes e amplamente testadas, a <i>N</i> -nitrosodimetilamina (NDMA) e 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-(butanona) (NNK), as quais têm limites recomendados de AI de 96 ng/dia e 100 ng/dia, respectivamente. <i>N</i> -nitrosaminas designadas na Categoria 2 são previstas ter potencial carcinogênico não superior ao da NDMA e da NNK.
3	400	Comparadas à Categoria de Potência 2, as <i>N</i> -nitrosaminas nesta categoria possuem uma potência carcinogênica mais baixa devido, por exemplo, à presença de uma característica estrutural fracamente desativante. O limite recomendado de AI foi estabelecido para refletir uma diminuição de 4 vezes na potência carcinogênica em relação à Categoria 2.
4	1500	As <i>N</i> -nitrosaminas designadas na Categoria 4 podem ser ativadas metabolicamente por meio de uma via de α -hidroxilação, mas prevê-se que tenham uma potência carcinogênica baixa, por exemplo, devido à desfavorecimento da via devido a influências estéricas ou eletrônicas, ou porque as vias de depuração são favorecidas. O limite recomendado de AI de 1500 ng/dia é estabelecido com base no TTC conforme guia ICH M7**.
5	1500	As <i>N</i> -nitrosaminas designadas na Categoria 5 são previstas para não serem ativadas metabolicamente por meio da via de α -hidroxilação devido a obstrução estérica ou à ausência de α -hidrogênios, ou prevê-se que formem espécies instáveis que não reagirão com o DNA. O limite recomendado de AI de 1500 ng/dia é estabelecido com base no TTC conforme guia ICH M7**.

TTC: limiar de preocupação toxicológica, do inglês *threshold of toxicological concern*; AI: ingestão/ exposição aceitável, do inglês *acceptable intake*

* Guia 50/2021, emissão inicial a versão vigente

** Veja o guia ICH M7(R2), M7Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals To Limit Potential Carcinogenic Risk. O Valor de limiar de preocupação toxicológica (TTC) de 1,5 μ g/dia (1500 ng/dia), conforme explicado no ICH M7, representa um AI para qualquer substância química não estudada que apresenta um risco negligenciável de carcinogenicidade ou de outros efeitos tóxicos.

Quadro 1 - Cinco Categorias Previstas de Potencial Carcinogênico e Limites Recomendados de IA Associados para NDSRIs

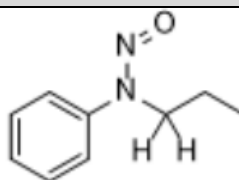
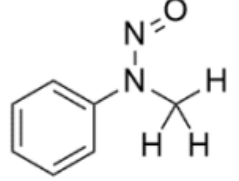
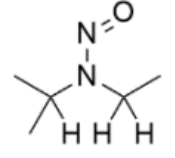
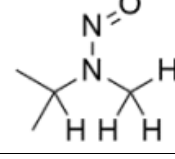
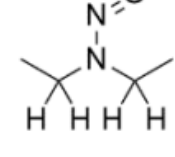
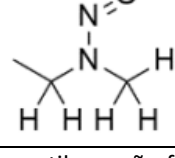
CÁLCULO DA PONTUAÇÃO DE POTÊNCIA

Para *N*-nitrosaminas não atribuídas à Categoria de Potência 5, a Pontuação de Potência é calculada como a soma da pontuação do α -hidrogênio (Quadro 3), pontuação das características desativadoras (Quadro 4) e pontuação das características ativadoras (Quadro 5) com base em características estruturais selecionadas presentes na *N*-nitrosamina. A estrutura da *N*-nitrosamina deve corresponder exatamente a uma das definições de α -hidrogênio no Quadro 3, mas pode conter múltiplas ou nenhuma característica estrutural identificada nos Quadros 4 e 5. Nos casos em que uma ou mais características dos Quadros 4 e 5 estão presentes

na *N*-nitrosamina, a Pontuação de Potência deve ser calculada conforme descrito do Quadro 2. Nos casos em que a *N*-nitrosamina não contém características dos Quadros 4 e 5, a Pontuação de Potência será igual à pontuação de α -hidrogênio.

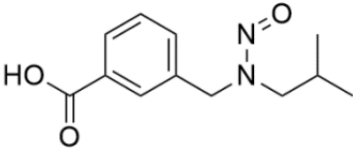
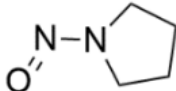
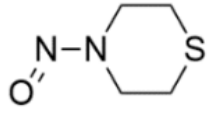
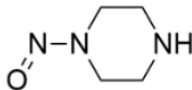
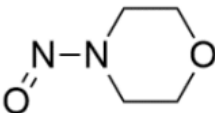
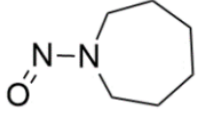
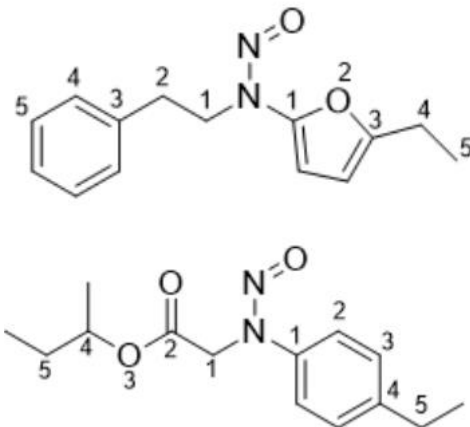
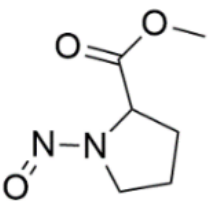
Pontuação de Potência = pontuação de α -hidrogênio + pontuação de características desativadoras (somar todas as pontuações para as características presentes na *N*-nitrosamina) **+ pontuação das características ativadoras** (somar todas as pontuações para as características presentes na *N*-nitrosamina).

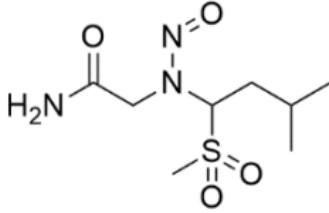
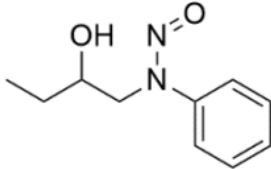
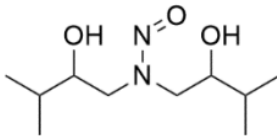
Quadro 2- Cálculo da pontuação de potência para *N*-nitrosamina.

Contagem de átomos de hidrogênio em cada α -carbono, do mais baixo para o mais alto	Exemplo	Pontuação de α -hidrogênio.
0,2		3*
0,3		2
1,2		3
1,3		3
2,2		1
2,3		1

*Uma pontuação de 3 se aplica quando o α -carbono metileno não faz parte de um grupo etila. Se o α -carbono metileno fizer parte de um grupo etila, deve-se aplicar uma pontuação de 2.

Quadro 3- Contagem de átomos de hidrogênio em cada carbono α (contagem mais baixa primeiro) e a correspondente pontuação de α -hidrogênio. Os exemplos são ilustrativos apenas e não têm a intenção de ser exaustivos.

Característica Desativante	Exemplo	Pontuação Individual de Característica Desativante
Ácido carboxílico em qualquer lugar na molécula		+3
N-nitroso em um anel de pirrolidina		+3
N-nitroso em um anel de 6 membros contendo pelo menos um átomo de enxofre		+3
N-nitroso em um anel de 5 ou 6 membros*		+2
Grupo N-nitroso em um anel de morfolina		+1
N-nitroso em um anel de 7 membros		+1
Cadeias de ≥ 5 átomos não hidrogênio consecutivos (cíclicos ou acíclicos) em ambos os lados do grupo N-nitroso acíclico. Não mais que 4 átomos em cada cadeia podem estar no mesmo anel		+1
Grupo retirador de elétrons** ligado ao α -carbono em apenas um lado do grupo N-nitroso (cíclico ou acíclico).		+1

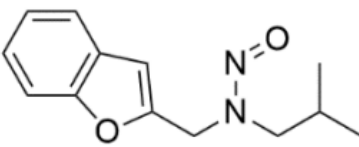
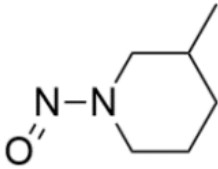
Característica Desativante	Exemplo	Pontuação Individual de Característica Desativante
Grupos retiradores de elétrons** ligados aos α -carbonos em ambos os lados do grupo N-nitroso (cíclico ou acíclico)		+2
Grupo hidroxila ligado ao β -carbono*** em apenas um lado do grupo N-nitroso (cíclico ou acíclico)		+1
Grupo hidroxila ligado ao β -carbono*** em ambos os lados do grupo N-nitroso (cíclico ou acíclico)		+2

*Exclui exemplos em que o grupo N-nitroso está em um anel de pirrolidina, em um anel de 6 membros contendo pelo menos um átomo de enxofre ou em um anel de morfolina (todos contados separadamente).

**Exclui ácido carboxílico e aril (contados separadamente) e cetona (dados conflitantes). Exemplos adicionais de grupos retiradores de elétrons são limitados aos descritos em Cross KP e Ponting DJ, 2021, Developing Structure-Activity Relationships for N-Nitrosamine Activity, Comput Toxicol, 20:100186, onde são referidos como "grupos retiradores de elétrons β -carbono".

***O β -carbono deve estar em estado de hibridização sp^3 para que essa característica se aplique.

Quadro 4- Lista de características desativadoras e suas pontuações associadas. Para calcular a pontuação de características desativadoras, soma-se as pontuações individuais para todas as características listadas presentes na estrutura da N-nitrosamina. Cada linha de característica desativadora na tabela só pode ser contada uma vez. Para N-nitrosaminas em que o grupo N-nitroso está dentro de mais de um anel, a pontuação de característica apenas para o menor anel correspondente deve ser aplicada. Os exemplos são ilustrativos apenas e não têm a intenção de ser exaustivos.

Característica ativadora	Exemplo	Pontuação Individual de Característica Ativadora
Grupo arila ligado ao α -carbono (ou seja, substituinte benzílico ou pseudo-benzílico no grupo N-nitroso).		- 1
Grupo metila ligado ao β -carbono (cíclico ou acíclico)		- 1

Quadro 5- Lista de características ativadoras e suas pontuações associadas. Para calcular a pontuação das características ativadoras, soma-se as pontuações individuais para todas as características listadas presentes na estrutura da N-nitrosamina. Cada linha de característica ativadora na tabela só pode ser contada uma vez. Os exemplos são ilustrativos apenas e não têm a intenção de ser exaustivos.

ANEXO III: Condições do teste de Ames otimizado para N-nitrosaminas

O Guia OECD nº 471- “*Bacterial Reverse Mutation Test*”⁶ é a principal referência para as recomendações do ensaio de mutação em bactérias, também conhecido como teste de Ames. No entanto, para N-nitrosaminas, condições otimizadas para a condução do teste de Ames são recomendadas, frente a já reportada baixa sensibilidade das condições padrão para algumas N-nitrosaminas como a NDMA (N-nitrosodimetilamina). Adicionalmente, pouco se sabe sobre a sensibilidade do ensaio para as NDSRIs (N-nitrosamine drug substance related impurities), que possuem uma variedade maior de grupos funcionais.

Caso o teste de Ames padrão OECD nº 471 foi conduzido e resultou positivo para a mutagenicidade, não há necessidade de conduzir teste de Ames adicional com as condições otimizada.

Nesse contexto, o FDA’s National Center for Toxicological Research (NCTR) e outros grupos avaliaram condições para melhorar a sensibilidade e aumentar a robustez das condições do teste de Ames aplicado para nitrosaminas (Li et. al., 2023⁷). Essas condições descritas a seguir são consideradas um protocolo para teste de Ames otimizado, o qual recomenda-se ser utilizado na avaliação de mutagenicidade de nitrosaminas. As condições descritas a seguir podem ser atualizadas frente a novas evidências. A presença de desvios ao protocolo pode ser justificada.

Cepas: Devem ser incluídas as cepas TA98, TA100, TA1535 e TA1537 de *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* WP2 uvrA (pKM101).

Tipo de ensaio e tempo de pré-incubação: Deve ser utilizado o método de pré-incubação em detrimento de incorporação em placa. O tempo de pré-incubação recomendado é de 30 minutos.

Espécie e concentração de S9: O ensaio deve ser conduzido tanto na ausência de ativação com fração pós-mitocondrial (S9) quanto na presença de S9 proveniente de fígado de rato a 30% e de S9 proveniente de fígado de hamster a 30%. As frações S9 de rato e hamster devem ser preparadas a partir de animais tratados com indutores das enzimas do citocromo P450 (por exemplo, uma combinação de fenobarbital e β -naftoflavona).

Controle negativo (veículo/solvente): Os solventes devem ser compatíveis com o teste de Ames padrão conforme Guia OECD 471. Os solventes de escolha podem incluir água e solventes orgânicos, como acetona, metanol e DMSO, não se limitando a esses. Quando um solvente orgânico for utilizado, o menor volume possível deve ser incluído na mistura de pré-incubação, acompanhado de justificativa que indique que o volume do solvente não interfere com a ativação metabólica da nitrosamina.

Controle positivo: Controles positivos específicos para as cepas devem ser incluídos de acordo Guia OECD 471. Complementarmente, duas N-nitrosaminas conhecidamente mutagênicas na presença de S9 devem ser incluídas como controle positivo.

A escolha das duas N-nitrosaminas para controle positivo deve ser justificada a partir do metabolismo das N-nitrosaminas e das principais enzimas do citocromo P450 envolvidas nesse metabolismo. A escolha pode considerar, entre outras: NDMA (CAS # 62-75-9), 1-Cyclopentyl-4-nitrosopiperazine (CAS # 61379-66-6) e uma NDSRI. Caso um solvente orgânico seja utilizado na solubilização da substância-teste, recomenda-se que se utilize um volume semelhante do solvente orgânico para dissolver as N-nitrosaminas utilizadas como controle positivo, resultando em uma concentração similar para a substância-teste na mistura de pré-incubação.

⁶ OECD (2020), Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071247-en>.

⁷ Li X, Le Y, Seo JE, Guo X, Li Y, Chen S, Mittelstaedt RA, Moore N, Guerrero S, Sims A, King ST, Atrakchi AH, McGovern TJ, Davis-Bruno KL, Keire DA, Elespuru RK, Heflich RH, Mei N. Revisiting the mutagenicity and genotoxicity of N-nitroso propranolol in bacterial and human in vitro assays. Regul Toxicol Pharmacol. 2023 Jun;141:105410. doi: 10.1016/j.yrtph.2023.105410. Epub 2023 May 18. PMID: 37210026.

Todas as demais condições devem seguir o recomendado no Guia OECD 471.

Destaca-se que caso um teste de Ames padrão (de acordo com do Guia OECD 471) tenha sido conduzido e apresentado resultado positivo, não há necessidade de conduzir ensaio adicional com a condição otimizada.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa
SIA Trecho 5, Área Especial 57, Lote 200
CEP: 71205-050
Brasília – DF

www.anvisa.gov.br

www.twitter.com/anvisa_oficial

Anvisa Atende: 0800-642-9782

ouvidoria@anvisa.gov.br