

# Notas de Aplicação e Boas Práticas de Avaliação

São Paulo, vol. 1, ed. 1, 2022.



## N-nitrosaminas: combinando a Análise de Risco de formação e a Avaliação de Risco Toxicológico

Carlos Eduardo Matos dos Santos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Alttox Ltda



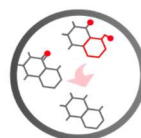
### OBJETIVOS

Garanta que a análise de risco, avaliação toxicológica e cálculo de limites abordem adequadamente as principais questões, de acordo com boas práticas e critérios localmente e internacionalmente aceitos.

Compreenda como deve ser analisado o risco de formação; quais questões considerar para a superação dos desafios da avaliação toxicológica e cálculo de limites aceitáveis; e como alguns softwares podem facilitar a análise de risco.



Genotox-iS™



iS-Purge

### RESUMO

Um conjunto de recomendações e etapas para avaliação de risco, confirmação e determinação de limites aceitáveis para N-nitrosaminas em medicamentos foi publicado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em 2021, no então "Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos" (Guia nº 50/2021 – versão 1). Temática repleta de desafios, até o momento, algumas vias de formação e contaminação estão sendo propostas com base nas experiências anteriores, e muito conhecimento novo tem sido produzido, o que pressupõe a necessidade de uma avaliação abrangente segundo a experiência acumulada passada, bem como uso de novos conhecimentos, ferramentas e entendimentos regulatórios em constante atualização. Este ensaio resume algumas das principais questões envolvidas na análise de risco de formação/contaminação, avaliação toxicológica e cálculo de limites para N-nitrosaminas, além de algumas soluções para superar desafios nesta temática

**Palavras-chave:** Nitrosaminas; impurezas; contaminação; análise de risco; impurezas mutagênicas.

---

## INTRODUÇÃO

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou em 2021 o "Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos" (Guia nº 50/2021 – versão 1), que reúne um conjunto de recomendações e etapas para avaliação de risco, confirmação e determinação de limites aceitáveis para N-nitrosaminas em medicamentos.

Segundo a agência, trata-se de instrumento regulatório não normativo, de caráter recomendatório e não vinculante, sendo, portanto, possível o uso de abordagens alternativas às proposições dispostas, desde que compatíveis com os requisitos relacionados ao caso concreto.

As recomendações locais e internacionais para análise e redução do risco de exposição a nitrosaminas estão centralizadas em duas etapas, com comunicação ao regulador ao final destas etapas a depender os resultados. A primeira etapa é a análise do risco de presença de nitrosaminas (neste caso, risco teórico ou potencial), e a segunda etapa, a confirmação do risco (risco realístico).

Com uma orientação quanto à ordem de prioridades na análise de risco portfólio, consideram-se como fatores dose máxima diária, duração do tratamento, indicação terapêutica e população de pacientes tratados. Uma maior prioridade deve ser atribuída a produtos com alta dose máxima diária, posologia prolongada (uso crônico), indicações terapêuticas de menor risco (fora do escopo do ICH S9 ou sem ativos per si com potencial mutagênico), medicamentos isentos de prescrição ou com indicações pediátricas.

Recentemente, além de produtos sintéticos, a EMA (European Medicines Agency) incluiu critérios para avaliação de produtos biológicos, sobretudo, aqueles com fragmentos sintéticos, embalados com blisters contendo nitrocelulose ou nos quais há emprego de agentes nitrosantes.

---

## ASPECTOS A SEREM CONSIDERADOS E CRITÉRIOS DE AVALIAÇÃO

### Etapa 1 – Análise de Risco (Risk Evaluation)

A primeira etapa está focada na análise do risco potencial de presença de nitrosaminas (traduzido preferencialmente desta forma, para que não seja confundida com uma avaliação de risco – Toxicological Risk Assessment), por formação ou contaminação. Ou seja, a resposta desta etapa está voltada para definir se há ou não risco de presença de nitrosaminas, e adicionalmente, pode envolver predições teóricas de formação e uso de knowledge-based para apontamento de estruturas de possíveis nitrosaminas que podem auxiliar a etapa seguinte.

Até o momento, algumas vias de formação e contaminação estão sendo propostas com base nas experiências anteriores, e muito conhecimento novo tem sido produzido. Uma avaliação abrangente para avaliar o risco da presença de nitrosaminas deve contemplar desde a rota de síntese e vias de degradação do fármaco (com avaliação de potenciais condições de formação nestas vias) às rotas de matérias-primas que possam favorecer a formação de N-nitrosaminas e contaminação, deste modo, cobrindo todo ciclo de fabricação com investigações tanto técnica como de Boas Práticas de Fabricação/Qualidade.

Um importante aspecto que vem sendo considerado na avaliação de relevância de uma formação teórica é não apenas o tipo de amina disponível quimicamente e o nível de susceptibilidade, mas o pKa da amina específica e o quanto é favorável a formação na condição e etapa específica (ex: pH e temperatura) em que há contato com o agente nitrosante. Neste sentido, o nível de conhecimento sobre o processo sintético e o auxílio do especialista em química orgânica são essenciais para análises

verdadeiramente robustas.

**Risco de formação de nitrosaminas** = Presença de agente nitrosante ou oxidante + Amina susceptível/vulnerável (secundária ou terciária) ou sais quaternários de amônio + Condição e etapa favorável

**Risco de contaminação por nitrosaminas** = Potenciais fontes de nitrosaminas ou contaminação por agentes susceptíveis à formação até a etapa de armazenamento do produto acabado em sua vida útil.

Algumas questões podem ser úteis na análise do risco de presença de nitrosaminas no IFA e no produto acabado:

- ✓ Existe uma amina vulnerável na estrutura do IFA e das impurezas de processo conhecidas?
- ✓ Existe risco de formação de N-nitrosaminas no processo sintético, considerando a combinação de reagentes, solventes, catalisadores, materiais de partida, intermediários formados, impurezas e degradantes formados em etapas específicas? O carreamento é plausível?
- ✓ Existe risco potencial de contaminação (ex: materiais recuperados, como reagentes, solventes, catalisadores, materiais de partida, intermediários, impurezas e degradantes, equipamento etc.) ou carreamento e interação de agentes inter-etapas? O carreamento é plausível?
- ✓ Existe risco de ocorrência de nitrosamina durante a fabricação do produto acabado ou ao longo do armazenamento na vida útil do produto? A formulação (excipientes e suas impurezas), o perfil de degradação, ou tipo de embalagem sugere risco de formação?
- ✓ Dado o panorama de possíveis causa-raiz, há risco de presença de nitrosaminas?
- ✓ Quais ações de mitigação podem ser adotadas com foco em cada causa-raiz identificada? O cenário de eliminação por mudança em qualquer variável do processo é plausível e viável?

### **Cálculo do Fator de Purga em rotas sintéticas e estimativas de eliminação de N-nitrosaminas do processo produtivo**

Conforme o Guia 50/2021 “caso tenha sido 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)”.

O software iS-Purge (Alttox Ltda) (Figura 1) é voltado para o cálculo do Fator de Purga<sup>1</sup>, Fator de Purga Requerido e Razão de Purga, tendo como resultado final uma decisão quanto à necessidade de testes analíticos e caso haja uma margem de aceitável nos cálculos, justifica a ausência da necessidade de testes analíticos (Opção 4 do ICH M7):



## Data input for the process

Impurity name <input type="text" value="N-nitrosamine compound"/>	Initial concentration (ppm) ? <input type="text" value="1000"/>	Acceptable limit (ppm) ? <input type="text" value="0,001"/>
<input type="button" value="Send"/>		

## Purge factor calculation

Stage	Operation	Reactivity	Solubility	Volatility	Ionisability	<input type="button" value="+"/> <input type="button" value="x"/>	Scientific Rationale	Purge Factor per Stage
1	Reaction	High - 100	Moderate - 3	Low - 1	High - 10		<input type="text"/>	3000
	Drying	Moderate - 10	Moderate - 3	Low - 1	High - 10		<input type="text"/>	300
	Washing	High - 100	Moderate - 3	Low - 1	High - 10		<input type="text"/>	3000
	Purification	Moderate - 10	Moderate - 3	Moderate - 3	High - 10		<input type="text"/>	900
								<input type="button" value="+"/> <input type="button" value="x"/>
								Total 2430000000000

Predicted Purge Factor = 2430000000000 (or 2.43E+12)

Required Purge Factor =  $\frac{\text{initial concentration}}{\text{acceptable limit}}$  = 1000000 (or 1E+6)

Purge Ratio =  $\frac{\text{predicted purge factor}}{\text{required purge factor}}$  = 2430000 (or 2.43E+6)

## Final result

Option 4 supported.

Provide purge ratio.

**Figura 1.** Tela do iS-Purge e cálculo do Fator de Purga, Fator de Purga Requerido e Razão de Purga.

<sup>1</sup>Teasdale, Andrew & Elder, David & Chang, Sou-Jen & Wang, Sophie & Thompson, Richard & Benz, Nancy & Flores, Ignacio. (2013). Risk Assessment of Genotoxic Impurities in New Chemical Entities: Strategies to Demonstrate Control. Organic Process Research & Development. 17. 221–230. 10.1021/op300268u.

---

## **Etapas 2- Testes confirmatórios**

Ferramentas clássicas de análise de risco (aplicadas inclusive no contexto do gerenciamento de risco de qualidade) podem ser extremamente úteis para auxiliar na quantificação de risco, ponderando-se em matriz os diferentes fatores de risco identificados, possibilitando a identificação de prioridades segundo a plausibilidade, relevância e dano potencial.

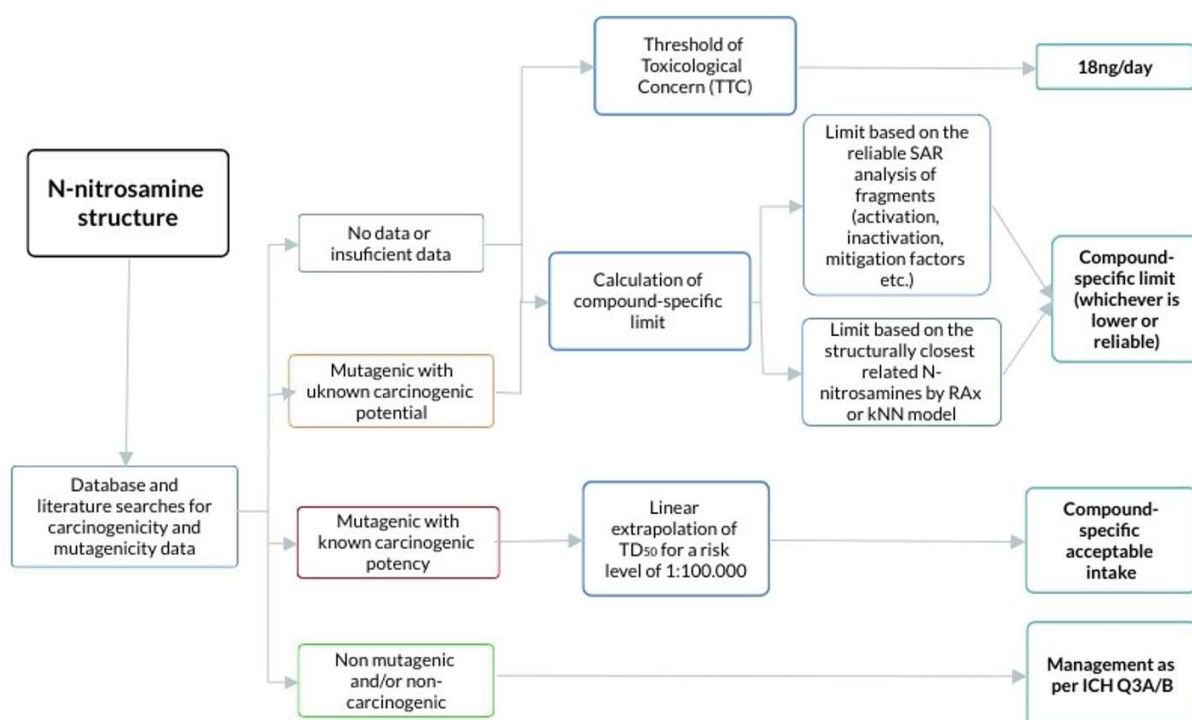
O report EMA/369136 propôs que após a análise do risco de formação deve ser conduzida a análise confirmatória, para a detecção de N-nitrosaminas, e neste sentido, havendo detecção, as medidas de controle e mitigação de riscos devem ser estabelecidas. De acordo com o Guia ANVISA, 50/2021, caso seja identificado 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. Para isso, a empresa deverá utilizar métodos analíticos adequadamente sensíveis para a quantificação dessas impurezas. Considera-se ausência de nitrosaminas quando esta estiver abaixo de 10% do limite de ingestão aceitável, porém outras abordagens podem ser justificadas, não excedendo o limite de 30%. Casos com excedentes demandam recolhimento, medidas de mitigação e alterações pós-registro focadas na causa raiz da formação ou contaminação.

Comentário do autor: classicamente, a experiência em avaliação de risco nos aponta que pode não ser uma estratégia efetiva fazer a interface entre “análise de risco de presença” de N-nitrosamina (ou potencial de exposição teórica), e uma “confirmação do risco” por meio de análises (potencial de exposição real), sem confirmar previamente se a N-nitrosamina faz parte do grupo de “coorte de alta preocupação” ou trata-se de uma N-nitrosamina de menor preocupação toxicológica, ou ainda, da plausibilidade da impureza ocorrer no estágio final de obtenção do IFA ou no produto acabado. As estratégias de controle deveriam ser focadas no risco de uma N-nitrosamina potencialmente mutagênica e/ou com potencial carcinogênico.

Antes da etapa de confirmação de risco (etapa analítica), no entendimento da Alttox, é considerado muito importante avaliar o potencial de toxicidade das N-nitrosaminas potencialmente formadas e apontadas no estudo teórico, para se ter uma ideia do horizonte analítico a ser colocado como meta e com mais elementos para o delineamento e priorização da etapa de confirmação experimental. Algumas N-nitrosaminas poderão ser consideradas não-mutagênicas, e conforme últimas discussões da EMA controladas como impurezas comuns (conforme critérios do ICH Q3A/B), enquanto que outras deverão ser controladas em limites muito restritivos de acordo com a potência. A ordem dos fatores em avaliação de risco é notavelmente alterador dos produtos, neste caso, podendo implicar no recolhimento de um produto pelo uso direto do TTC de 18ng/dia para nitrosaminas novas como um limite. No provável cenário de haver pouco detalhamento das etapas sintéticas ou ocorrência de vários produtos com algum nível de risco “de presença”, o perfil toxicológico é essencial para apontar prioridades e nível de esforços da etapa confirmatória.

## ESTRATÉGIA DE AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA E CÁLCULO PARA A ATRIBUIÇÃO DE LIMITES DE ACEITAÇÃO

A primeira investigação a se ter em mente após a identificação de uma potencial N-nitrosamina em um determinado IFA ou produto é se esta N-nitrosamina é de fato mutagênica ou carcinogênica. A Figura 2 resume as implicações no cálculo dos limites que podem ser produto da estrutura da N-nitrosamina. Este é o nosso workflow sugerido para a avaliação toxicológica de N-nitrosaminas e determinação de limites aceitáveis.



**Figura 2.** Workflow sugerido para a avaliação toxicológica de N-nitrosaminas e determinação de limites aceitáveis.

### Modelos *in silico* e Read-across (RAx)

Mais do que o mero uso automatizado de modelos *in silico*, um profundo domínio de métodos de estudos de Relação Estrutura-atividade (SAR) será necessário, para avaliar a interferência dos grupamentos R1 e R2 laterais (e outros) da N-nitrosamina, com a verificação de grupamentos atenuadores, neutros ou de potenciação da resposta mutagênica e carcinogênica.

Conforme o racional proposto pela EMA, o uso de modelos de relação estrutura-atividade (SAR) e Read-across com análogos estruturais podem ser muito úteis na avaliação toxicológica. Modelos com descritores estruturais adequados para detecção destes padrões e ferramentas de inspeção visual podem ser bastante úteis neste contexto. Na figura abaixo, pelo Mapa de Probabilidade, é possível identificar nas estruturas de nitrosaminas grupamentos capazes de atenuar ou cessar (em verde) ou manter/potencializar a atividade mutagênica da nitrosamina (em vermelho) (Figura 3).



Genotox-iS™

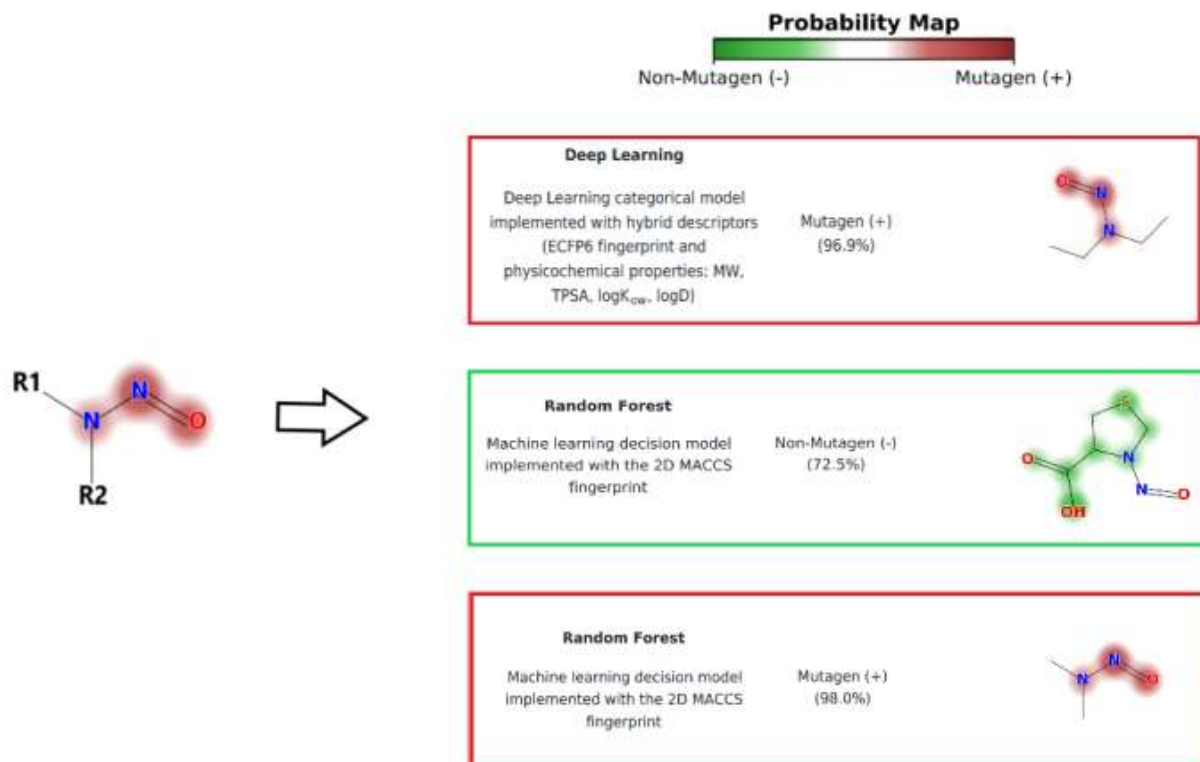


Figura 3. Avaliação de Nitrosaminas com o nosso software [Genotox-iS](#). O mapa de probabilidade permite obter indicativos que diferenciam nitrosaminas mutagênicas daquelas sem potencial mutagênico.

Algumas questões serão consideradas relevantes na avaliação toxicológica de perigo:

- ✓ A nitrosamina possui dados prévios de toxicidade?
- ✓ Há dados de relação dose-resposta (ex: TD<sub>50</sub>) adequados e a extrapolação linear da TD<sub>50</sub> para um limite com nível risco carcinogênico de 1:100.000 será considerada confiável?
- ✓ A nitrosamina formada apresenta as características estruturais sugestivas de potência e MOA (mecanismo de ação) genotóxico e carcinogênico, ou há fragmentos atenuadores?
- ✓ Em caso de insuficiência de dados, com base em estudos de Relação Estrutura-atividade (SAR) é possível determinar um limite aceitável específico para a nitrosamina?



## ATRIBUIÇÃO DE LIMITES DE ACEITAÇÃO

O limite de aceitação dependerá elementarmente das características de perigo da N-nitrosamina (Figura 2). Na etapa de cálculo do limite aceitável para a N-nitrosamina, algumas questões e diretrizes regulatórias poderão nortear a avaliação:

- ✓ O limite toxicológico pode ser calculado? Valores pragmáticos ou read-across podem ser aplicados como alternativa?
- ✓ O nível de formação/contaminação para a nitrosamina está abaixo do limite considerado seguro? Este limite é alcançável tecnicamente?
- ✓ Há mais de uma N-nitrosamina? Os limites podem ser ajustados no caso prático para manter o risco de 1: 100.000?
- ✓ Em caso de formação de mais de uma nitrosamina, o critério de decisão deve ser baseado no risco resultante ou a mera ocorrência de 2 nitrosaminas é suficiente para descontinuar o produto? (há diferentes critérios propostos pela ANVISA, OMS, critério do ICH M7 e critério EMA)
- ✓ Em casos de limites toxicológicos abaixo do limite técnico, o produto será descontinuado ou uma análise do risco-benefício será aplicada?
- ✓ O ajuste dos limites para posologias com duração menor que o período vital pode ser determinado (less-than-lifetime)? (há diferentes critérios propostos pela ANVISA, OMS, critério do ICH M7 e critério EMA)



## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

A temática de Avaliação e Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos é de fato desafiadora, e com ampla variação nos níveis de complexidade em cada caso e causa-raiz. Longe de esgotar o tema, as respostas às questões colocadas neste ensaio, junto às atuais diretrizes regulatórias, podem nortear avaliações de segurança robustas, mitigando riscos regulatórios. Certamente novas estratégias devem surgir e serão baseadas nas experiências sendo construídas para a resolução dos principais desafios atuais.

Com um arsenal de ferramentas adequado; conhecimentos de Toxicologia e Avaliação de Risco; e, pelas interfaces de conhecimento, a união de expertises de Toxicologia, Química Orgânica, Qualidade e Assuntos Regulatórios; certamente há como resultante maior chance de êxito regulatório nestes desafios e produtos mais seguros.

### *Key points:*

- Há vários desafios na avaliação e controle de risco de N-nitrosaminas;
- As características estruturais são o ponto de partida para a avaliação toxicológica;
- O uso de ferramentas computacionais/softwarewares poderá suportar e direcionar as avaliações de risco, racionalizar experimentos e definir limites aceitáveis;
- Há uma tendência em adotar os princípios de Gerenciamento de Risco de Qualidade, para gerenciar de forma macro os potenciais riscos de diferentes fontes.

Ensaio adaptado de “N-nitrosaminas: combinando a Análise de Risco de formação e a Avaliação de Risco Toxicológico”. Disponível em: <https://altox.com.br/n-nitrosaminas-combinando-a-analise-de-risco-de-formacao-e-a-avaliacao-de-risco-toxicologico>

---

## REFERÊNCIAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária em 2021. "Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos"(Guia nº 50/2021 – versão 1)

European Medicines Agenci. EMA/369136/2020. Assessment report – Nitrosamine impurities in human medicinal products. Disponível em: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf)

International Council for Harmonisation. ICH M7: assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk, 2015.

Teasdale, Andrew & Elder, David & Chang, Sou-Jen & Wang, Sophie & Thompson, Richard & Benz, Nancy & Flores, Ignacio. (2013). Risk Assessment of Genotoxic Impurities in New Chemical Entities: Strategies to Demonstrate Control. Organic Process Research & Development. 17. 221–230. 10.1021/op300268u.



Av. Dr. Vital Brasil - n. 305 - 8º  
Andar - cj 803 - CEP 05503-001  
• Butantã  
• São Paulo - SP  
[alttox.com.br](http://alttox.com.br)  
©2021 Alttox Ltda