

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
BACHARELADO EM QUÍMICA**

LETÍCIA SATIKO SEO

**CONTROLE DE IMPUREZAS EM INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS:
NITROSAMINAS**

São Carlos - SP
2024

Letícia Satiko Seo

CONTROLE DE IMPUREZAS EM INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS:
NITROSAMINAS

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de São Carlos,
para obtenção do título de Bacharel em
Química.

Orientadora: Profa. Dra. Dulce Helena
Ferreira de Souza

Co-orientador: Dr. Luis Felipe da Silva

São Carlos - SP

2024

Agradecimentos

Deixo registrado nestas linhas o meu profundo agradecimento a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para o meu desenvolvimento, tanto acadêmico quanto profissional e, acima de tudo, como cidadã.

Aos esforços e sacrifícios que a minha família se submeteu para que eu pudesse chegar até este momento. Sem a perseverança da minha mãe em lutar para me dar um estudo de qualidade, a dedicação do meu pai em me levar a qualquer lugar onde coubesse um sonho e o carinho e apoio infindável do meu irmão, talvez eu não tivesse ido tão longe.

Ao meu namorado que sempre me incentivou a ir atrás dos meus objetivos, independentemente das dificuldades que a distância nos trouxesse; que sempre celebrou as minhas conquistas e sempre, com muita paciência e carinho, me lembrou das minhas capacidades nos momentos de dúvida.

Também agradeço imensamente aos amigos que estiveram ao meu lado nessa jornada e que se constituíram como uma segunda família para mim, sempre trazendo leveza, carinho, acolhimento e muitos ensinamentos. Amo cada um de vocês.

Ao grupo LaBioMMi que me apresentou a beleza e o potencial da pesquisa sobre microorganismos - aqueles que são invisíveis aos olhos, mas com um potencial imensurável. Além dos ensinamentos acadêmicos, carrego no peito um carinho imenso pelo grupo que me acolheu em 2017 e pelas amigadas que me inspiraram a ser a mulher que me tornei. Obrigada Daiane, Tatiana e Amanda.

Ao grupo PET Química que muito me ensinou sobre a importância do comprometimento individual e coletivo com a educação, sobre empatia e cidadania, sobre aprender com os erros e acertos para crescer. Com vocês também aprendi que nenhuma voz deve ser calada, a democracia e a horizontalidade são os melhores caminhos para podermos construir uma sociedade melhor e igualitária.

Por fim, divido essa conquista com todas as pessoas e grupos que contribuíram para que esse momento chegasse, para que eu me tornasse a pessoa que sou e um dia poderei me tornar. Tenho certeza de que sigo para uma nova etapa carregando comigo as melhores referências que pude ter até aqui.

Resumo

O controle de impurezas em insumos farmacêuticos ativos, em especial a classe das N-nitrosaminas, é um tema bastante relevante na indústria farmacêutica contemporânea por pertencerem ao “Grupo de Preocupação” (*Cohort of Concern*), conforme a classificação do Guia ICH M7 (R1).

O destaque para o controle de N-nitrosaminas está nas suas propriedades mutagênicas e, segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*), potencialmente carcinogênicas e genotóxicas em circunstâncias de alta exposição prolongada ¹.

A crescente conscientização sobre essas impurezas tem motivado a revisão constante e aprimoramento dos padrões regulatórios da farmacovigilância.

Nesse contexto, pretende-se apresentar uma revisão sobre os impactos das N-nitrosaminas nas indústrias farmacêuticas, incluindo as medidas e ações tomadas pelas agências reguladoras ao redor do mundo.

Portanto, os principais objetivos deste Trabalho de Conclusão de Curso serão fornecer informações relevantes sobre os estudos relacionados à origem e presença de N-nitrosaminas em medicamentos. Adicionalmente, apresentar um panorama acerca da evolução do modelo normativo no controle de impurezas, ressaltando fatores que levaram ao modelo atual e buscar explorar e discutir os limites aceitáveis de exposição às impurezas, bem como os métodos analíticos.

Palavras-chave: N-nitrosaminas; Insumos Farmacêuticos Ativos; Impurezas farmacêuticas; Controle de qualidade.

Abstract

The control of impurities in active pharmaceutical ingredients, particularly in the class of N-nitrosamines, is a highly relevant topic in the contemporary pharmaceutical industry as they belong to the "Cohort of Concern," classified by the ICH M7 (R1) guideline.

The emphasis on the control of N-nitrosamines lies in their mutagenic properties and, according to the International Agency for Research on Cancer (IARC), the potentially carcinogenic and genotoxic influences under conditions of prolonged high exposure.

The growing awareness of these impurities has prompted a continual review and enhancement of pharmacovigilance regulatory standards. In this context, the intention is to provide a comprehensive review of the impacts of N-nitrosamines on the pharmaceutical industries, including the measures and actions taken by regulatory agencies worldwide. Thus, the main objectives of this Thesis will be to provide information on studies related to the origin and presence of N-nitrosamines in medications. Additionally, it aims to present an overview of the evolution of the regulatory model in impurity control, highlighting factors that led to the current model. The goal is also to explore and discuss acceptable limits of exposure to impurities, as well as analytical methods.

Key-words: N-nitrosamines; Active Pharmaceutical Ingredients; Pharmaceuticals impurities; Quality control

Lista de Figuras

Figura 1.1 - Tendência de investimento, em dólares, das indústrias farmacêuticas nos últimos anos.....	12
Figura 1.4 - Estrutura geral de N-Nitrosaminas.	15
Figura 1.4.1.1 - Formação de nitrosaminas por nitrosação com ácido nitroso obtido a partir de nitrito de sódio em meio ácido.	16
Figura 1.4.1.2 - Degradação da dimetilformamida (DMF) formando N-nitrosodimetilamina (NDMA).....	17
Figura 1.4.1.3 - Solventes que contribuem para a formação de N-nitrosaminas.	18
Figura 2.1.1 - Perspectiva cronológica de estudos acerca das N-nitrosaminas.....	19
Figura 2.1.2 - Evolução nas publicações com a palavra chave ' <i>nitrosamine</i> '.	20
Figura 2.1.3 - Representação do experimento realizado em roedores por Magee e Barnes.	20
Figura 2.2.1 - Representação da ação do NDMA no DNA.	24
Figura 2.2.2 - Bases nitrogenadas e seus respectivos adutos formados pela presença de NDMA.	25
Figura 2.3 - Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas com injetor de <i>HeadSpace</i>	29

Lista de Tabelas

Tabela 1. Limite individual de ingestão diária para N-nitrosaminas presentes em medicamentos.....	27
Tabela 2. Limite aceitáveis provisórios para NDMA, NDEA e NMBA em sartanas adotados pela FDA.....	28

Lista de Siglas e Abreviações

AI - *Acceptable Intake*

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DBA - Dibenzilidenoacetona

DIPEA – N, N-Di-isopropiletilamina

DMA - Dimetilamina

DMD - Dose Diária Máxima

DMF – Dimetilformamida

EDQM - *European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare*

EIPNA - Etilisopropil-nitrosamina

EMA - *European Medicines Agency*

FDA - *Food and Drugs Administration*

GC-MS - *Gas Chromatography Mass Spectrometry*

GELAS - Gerência de Laboratórios de Saúde Pública

GGMED - Gerência-Geral de Medicamentos e Produtos Biológicos

GIMES/GGFIS - Gerência de Inspeção e Fiscalização de Medicamentos e Insumos Farmacêuticos

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

ICH - *International Council for Harmonisation*

IFA - Insumo Farmacêutico Ativo

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Fiocruz)

kg - quilograma

LC-MS - *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*

LLE - *Liquid-Liquid Extraction*

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MBA – N, N-metileno-bisacrilamida

MeNP - N-nitroso-N'-metilpiperazina

mg – miligrama

NDBA – N-nitrosodibutilamina

NDEA - N-nitrosodietilamina

NDMA – N-nitrosodimetilamina

NDPA – N-nitrosodipropilamina

ng – nanograma

NMBA - Ácido N-nitroso-N-metil-4-aminobutírico

NMOR - N-nitrosomorfolina

NMP – N-metilpirrolidona

NMPA - Metilfenilnitrosamina

NNV - N-nitroso-vareniclina

NPIP - N-nitrosopiperidina

P&D - Pesquisa e Desenvolvimento

ppm – parte por milhão

RDC - Resolução de Diretoria Colegiada

SPE - *Solid Phase Extraction*

SQR – Substância Química de Referência

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TEA - Trietilamina

TTC - *Threshold of Toxicological Concern*

USP - *United States Pharmacopeia Convention*

Sumário

1 Introdução	12
1.1 Panorama sobre o desenvolvimento e comercialização de medicamentos	12
1.2 Insumos farmacêuticos ativos	13
1.3 Impurezas	15
1.4 Nitrosaminas	16
1.4.1 Formação de nitrosaminas	16
2 Revisão literária	19
2.1 Evolução dos estudos sobre a presença de nitrosaminas em medicamentos: Uma perspectiva cronológica	19
2.2 Exposição prolongada às N-nitrosaminas	23
2.3 Aspectos legislativos e as ações da farmacovigilância	25
2.4 Controle de qualidade	31
2.4.1 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos	31
2.4.1.1 Parâmetros para uma validação analítica	32
2.4.1.1.1 Seletividade	32
2.4.1.1.2 Linearidade	32
2.4.1.1.3 Efeito Matriz	32
2.4.1.1.4 Precisão	33
2.4.1.1.5 Exatidão	33
2.4.1.1.6 Limite de Detecção	33
2.4.1.1.7 Limite de Quantificação	33
2.4.1.1.8 Robustez	34
2.5.1 Métodos analíticos	34
3 Considerações Finais	37
4 Referências Bibliográficas	38

1 INTRODUÇÃO

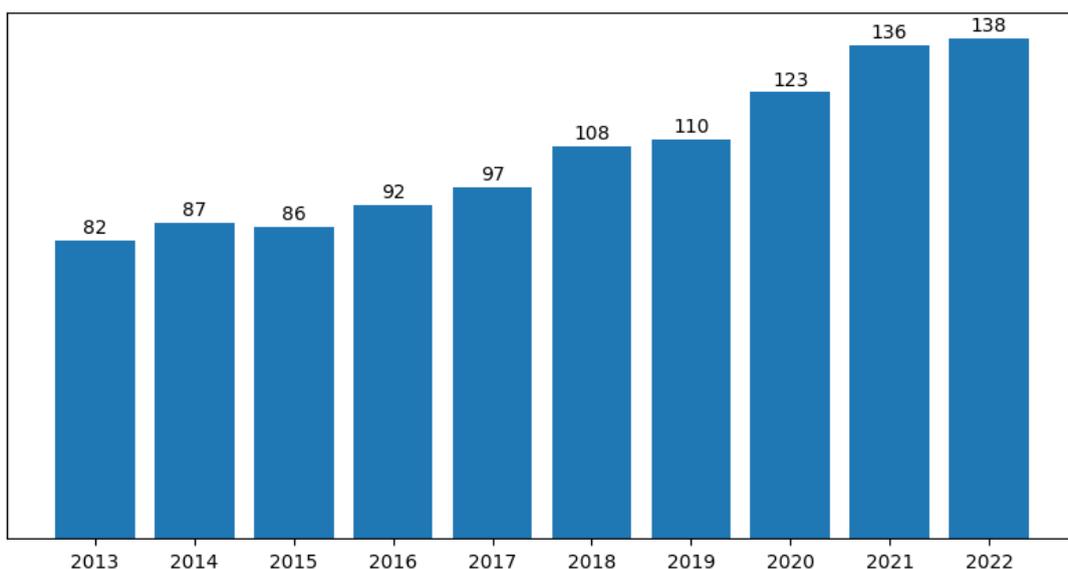
1.1 Panorama sobre o desenvolvimento e comercialização de medicamentos

O uso de medicamentos, tanto para o tratamento de enfermidades quanto para o alívio de sintomas, é uma prática intrinsecamente ligada à melhoria da qualidade de vida humana. Desde a utilização de ervas medicinais até o isolamento de substâncias específicas a partir de plantas, como a morfina (isolada do ópio por Freidrich Sertürner no século XIX)^{2,3} ou a penicilina (descoberta no século XX por Alexander Fleming e isolada a partir de um fungo)⁴, a trajetória da indústria farmacêutica é marcada por acontecimentos e inovações científicas significativas.

Nesse sentido, ao longo dos anos, observa-se uma tendência cada vez maior de investimentos no setor de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) dentro das indústrias (Figura 1.1).

Segundo o relatório “*Global Trends in R&D 2023: Activity, Productivity, and Enablers*” (Tendências globais em P&D 2023: Atividade, Produtividade e Habilitadores) publicado pelo IQVIA *Institute for Human Data Science*, o financiamento para o setor de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) mundial pelas indústrias farmacêuticas foi recorde em 2022, tendo sido investidos cerca de US\$138 bilhões em novos medicamentos e terapias^{5,6}.

Figura 1.1 - Tendência de investimento, em dólares, das indústrias farmacêuticas nos últimos anos.



Fonte: Adaptado de Inovação e Pesquisa⁵.

Na América Latina, o mercado farmacêutico é liderado pelo Brasil que, por sua vez, movimentou cerca de *US\$ 20,70 bilhões* no ano de 2022, à frente de países como o México, Colômbia e a Argentina⁷.

Esses investimentos justificam-se pelo risco da inovação e pela necessidade de novas terapias, uma vez que as doenças crônicas e complexas têm se tornado cada vez mais frequentes com o envelhecimento da população⁸.

Por outro lado, como consequência das altas demandas por lançamentos de novas drogas, sem uma profunda investigação sobre possíveis contaminações por impurezas e seus efeitos adversos, a farmacologia moderna também apresentou falhas no sistema de controle de qualidade. Casos como a tragédia da Talidomida evidenciaram a urgência para um controle sanitário mais rigoroso que, por sua vez, também incentivou a expansão da autoridade do Estado sobre as indústrias farmacêuticas^{9,10}.

Apresentada nos anos 1950 como droga mágica, a talidomida foi posteriormente proibida por seus efeitos deletérios [...]. Dada a tragédia que a circundou, foi um dos medicamentos mais importantes do século XX em termos de mobilização da legislação de saúde, constituindo o ponto de partida para a aplicação dos conceitos de segurança e farmacovigilância dos medicamentos. Desencadeou, também, debates éticos sobre o comportamento da indústria farmacêutica e sobre as condições de vida e os direitos das pessoas com deficiências causadas pelo medicamento⁹.

Nesse contexto, com os processos de farmacovigilância se tornando cada vez mais alinhados e rigorosos entre as agências reguladoras, houve uma tendência das pesquisas farmacêuticas se tornarem cada vez mais colaborativas entre empresas, startups e instituições de pesquisa¹¹.

Assim, para a aprovação e realização do comércio de novos fármacos, estes devem passar por diversos tipos de ensaios não clínicos e clínicos que comprovem a eficácia e, principalmente, a segurança do consumidor¹¹.

Por conseguinte, ao se determinar uma molécula promissora, candidata a se tornar um novo Insumo Farmacêutico Ativo (IFA), ela passará por diversas investigações sobre o seu mecanismo de atuação em células *in vitro* e em animais *in vivo* para avaliar uma possível dosagem adequada à humanos^{11,12}. Caso seja determinada a sua segurança para administração em humanos, o novo ativo seguirá para os testes clínicos, aos quais os estudos também buscam avaliar a segurança e eficiência do medicamento em seres humanos.

É imprescindível ressaltar que, para dar início a quaisquer testes clínicos, a pesquisa deve receber aprovação de instâncias de ética e técnica, a fim de garantir a seguridade dos voluntários envolvidos no estudo¹².

Após a obtenção das certificações de qualidade, segurança e eficácia, a nova droga deverá ser registrada e autorizada para comercialização junto ao órgão responsável ¹².

No Brasil, vinculado ao Ministério da Saúde, o principal órgão responsável por regulamentar e fiscalizar as atividades da indústria farmacêutica é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esta organização desempenha um papel fundamental de estabelecer normativas técnicas com orientações sobre os processos essenciais às boas práticas e padrões de qualidade para a disponibilização e comércio de produtos e serviços sob certificação. Muitas dessas normativas são dispostas através de Resoluções de Diretoria Colegiada (RDC).

É importante destacar que, regularmente, as ações de fiscalização e monitoramento da ANVISA estão em conformidade com agências e organizações internacionais, como a Agência Europeia de Medicamentos (EMA, *European Medicines Agency*), a Agência de Medicamentos e Alimentos dos Estados Unidos da América (FDA, *Food and Drug Administration*) e organizações como a Direção Europeia para a Qualidade dos Medicamentos e Cuidados de Saúde (EDQM, *European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare*), Farmacopeia Americana (USP, *United States Pharmacopeia Convention*) e a Organização Mundial da Saúde (WHO, *World Health Organization*)^{13,14}.

Devido a esta sinergia entre as agências mundiais e, a fim de preservar o bem-estar da população, quaisquer falhas detectadas nos sistemas de controle qualidade deverá ser reportadas e divulgadas para que as ações corretivas sejam implementadas.

1.2 Insumos farmacêuticos ativos

Segundo a ANVISA, considera-se insumo farmacêutico ativo (IFA), a substância a qual atribui ao medicamento a sua característica farmacêutica, ou seja, aquele que constitui o princípio ativo de um determinado medicamento ¹⁵.

Os IFA's estão sujeitos à vigilância sanitária conforme previsto pela RDC 362/2020 a qual dispõe sobre os critérios para certificação de Boas Práticas de Fabricação e institui o programa de inspeção para estabelecimentos internacionais fabricantes de insumos farmacêuticos ativos.

Além disso, a ANVISA também disponibiliza a Farmacopéia Brasileira 6ª Edição, volumes I e II (última atualização pela RDC nº 832, de 11 de dezembro de

2023), na qual trata-se de um guia para orientar sobre os requisitos mínimos de qualidade, autenticidade e pureza para matérias primas destinadas ao desenvolvimento e fabricação de medicamentos e produtos para a saúde.

1.3 Impurezas

São consideradas impurezas farmacêuticas, as substâncias indesejadas presentes em produtos farmacêuticos, sejam elas obtidas a partir de produtos de degradação dos IFA's e/ou excipientes ou como resultado de reações secundárias durante os processos de síntese ^{16,17}.

As impurezas de degradação podem ocorrer ao longo do tempo de vida do produto em exposição, por meio de oxidação lenta com o ar atmosférico, absorção de umidade ocasionando em hidrólises, fotodegradação, degradações térmicas ocasionadas pelo armazenamento inadequado, entre outros. Já as impurezas provenientes da rota sintética, podem ocorrer durante a fabricação das matérias primas, seja por solventes residuais em reatores ou por reações secundárias entre o excipiente e o IFA ^{16,17}.

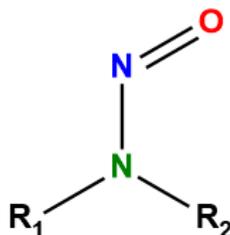
A presença das N-nitrosaminas como impurezas em IFA's e medicamentos já foi reportada tanto como provenientes de rotas de degradação quanto pelo uso de reagentes que contribuíram para sua formação por reações secundárias.

De qualquer modo, além de interferir nos tratamentos aos quais os medicamentos se destinam, elas também podem contribuir para o desenvolvimento de novas doenças em seus consumidores.

1.4 Nitrosaminas

Segundo o “Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos - Guia nº 50/2021 - Versão 3”, as N-nitrosaminas representam uma classe de compostos químicos caracterizados pela presença da ligação entre um grupo nitroso (-N=O) à um grupo amina (>N-) (Figura 1.4) ¹⁸.

Figura 1.4 - Estrutura geral de N-Nitrosaminas.



Fonte: ANVISA - Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos¹⁸.

Dentro dessa classe de compostos, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classifica boa parte dessas moléculas como agentes de risco devido ao seu potencial mutagênico, genotóxico e carcinogênico para humanos^{1,18}.

Devido a essas propriedades, se faz evidente a necessidade no controle rigoroso quanto aos limites considerados aceitáveis e seguros, uma vez que a exposição contínua e prolongada, pode corroborar para o desenvolvimento de doenças cancerígenas.

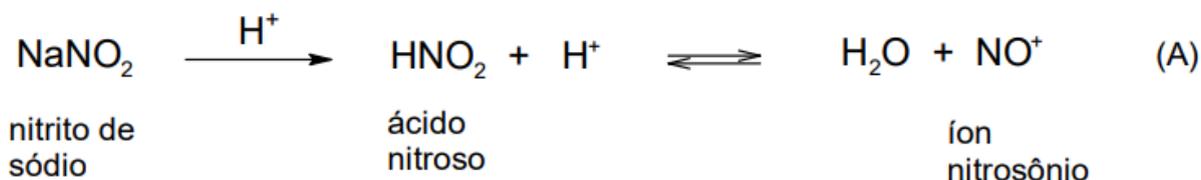
1.4.1 Formação de nitrosaminas

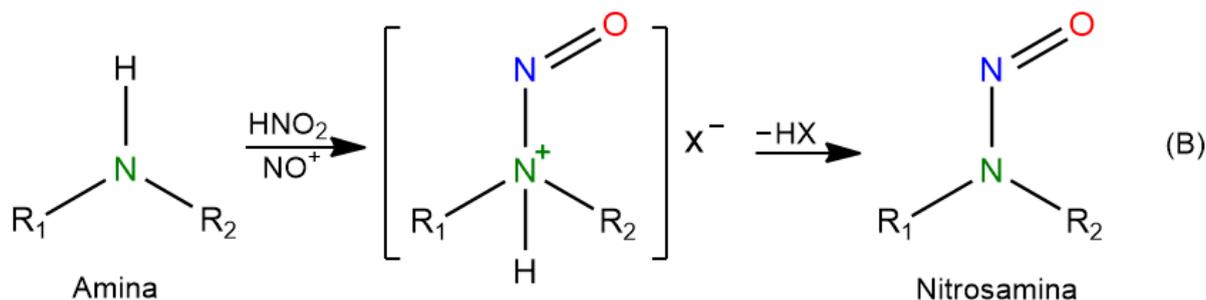
A respeito da formação das nitrosaminas, elas podem ocorrer a partir da reação entre aminas e agentes nitrosantes sob determinadas condições de pH acidificado. Por exemplo, uma pessoa que tem uma alimentação baseada em alimentos processados, que são ricos em nitritos e nitratos, contribui para a formação do ácido nitroso em seu organismo¹⁹.

O ácido nitroso, por sua vez, é um composto instável que em meio ácido, pode levar à geração do íon nitrosônio (Figura 1.4.1.1 A)¹⁷. Conseqüentemente, o íon nitrosônio favorece a reação de nitrosação de aminas secundárias, terciárias e compostos de amônio quaternário pelo ácido nitroso (Figura 1.4.1.1 B) resultando na formação das N-nitrosaminas¹⁸.

A estrutura final da nitrosamina irá depender da estrutura da amina precursora que, por sua vez, sofreu a nitrosação¹⁸.

Figura 1.4.1.1 - Formação de nitrosaminas por nitrosação com ácido nitroso obtido a partir de nitrito de sódio em meio ácido.

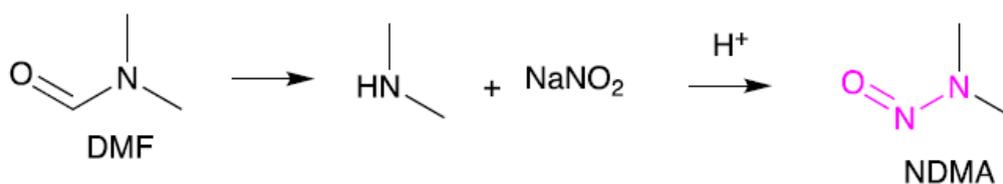




Fonte: adaptação do Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos ¹⁸.

Na indústria farmacêutica, as principais fontes de contaminação em medicamentos ocorrem devido à presença simultânea de aminas secundárias ou terciárias com agentes nitrosantes, como o nitrito. Esses precursores podem estar presentes em uma mesma etapa de síntese do IFA pela limpeza ineficiente dos reatores entre diferentes bateladas de produção; em solventes como dimetilformamida (DMF), que podem sofrer hidrólise ou degradação térmica gerando a dimetilamina (DMA), que por sua vez reage com nitrito de sódio em meio acidificado, levando à formação da N-nitrosodimetilamina (NDMA) (Figura 1.4.1.2) ou outros solventes (Figura 1.4.1.3); pela interação entre o composto farmacêutico com excipientes que contém níveis residuais de nitrato e/ou nitrito ou até mesmo pela degradação térmica durante o tempo de prateleira do medicamento ^{13,18}.

Figura 1.4.1.2 - Degradação da dimetilformamida (DMF) formando N-nitrosodimetilamina (NDMA)

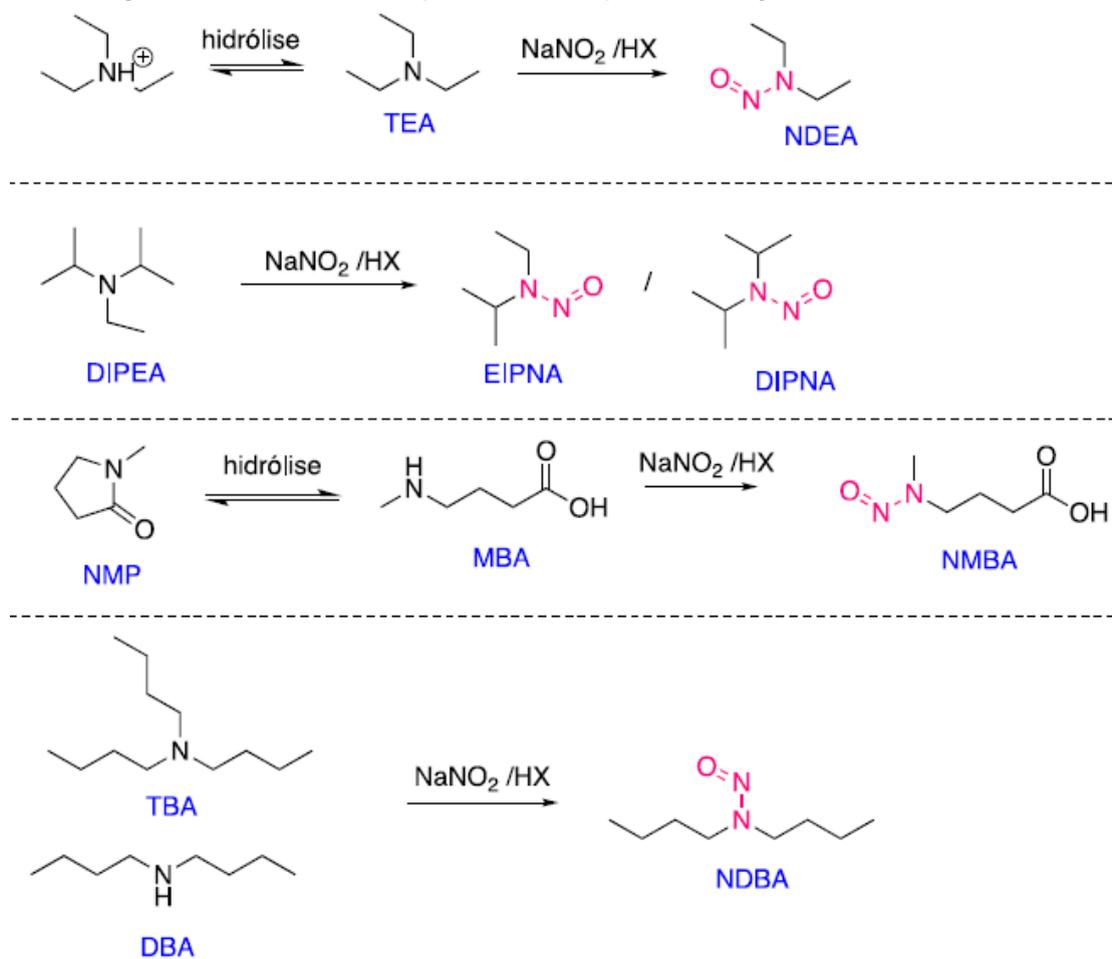


Fonte: Aglio *et al.* ¹³

Já na indústria alimentícia, esses compostos podem ser encontrados na água, carne curada, peixe processado, bebidas alcoólicas e não alcoólicas, óleos, vegetais processados e queijos ¹⁸.

Nesse sentido fica cada vez mais evidente a necessidade e urgência de se conhecer cada etapa dos processos industriais, bem como se desenvolver um controle de qualidade ativo e contínuo atento às etapas de risco de formação dessas impurezas.

Figura 1.4.1.3 - Solventes que contribuem para a formação de N-nitrosaminas.



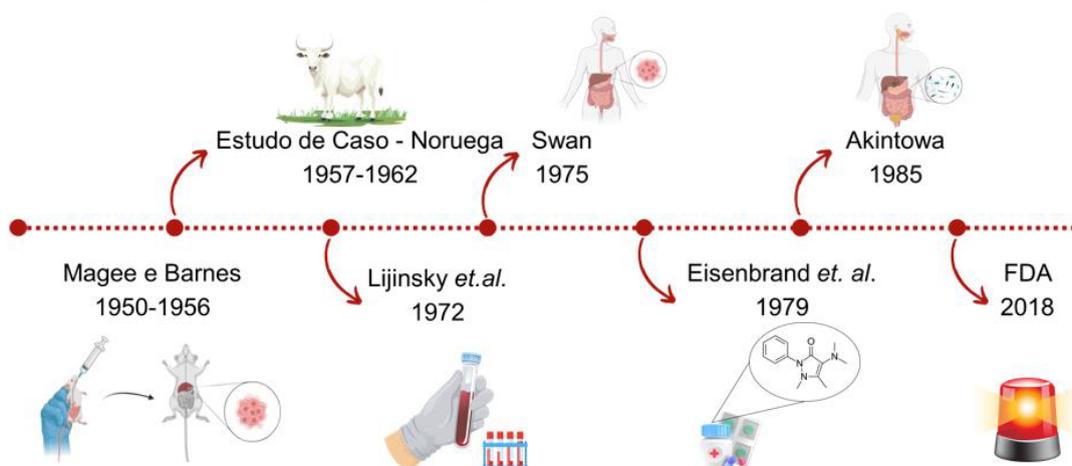
Fonte: Aglio *et al.* ¹³.

2 Revisão literária

2.1 Evolução dos estudos sobre a presença de nitrosaminas em IFA e medicamentos: Uma perspectiva cronológica

A presença de N-nitrosaminas em diferentes tipos de produtos destinados ao consumo humano é alvo de estudos há décadas e, quanto mais dados e constatações se produziram em relação aos impactos causados por essa impureza, mais alertas se acenderam ao redor do mundo (Figura 2.1.1).

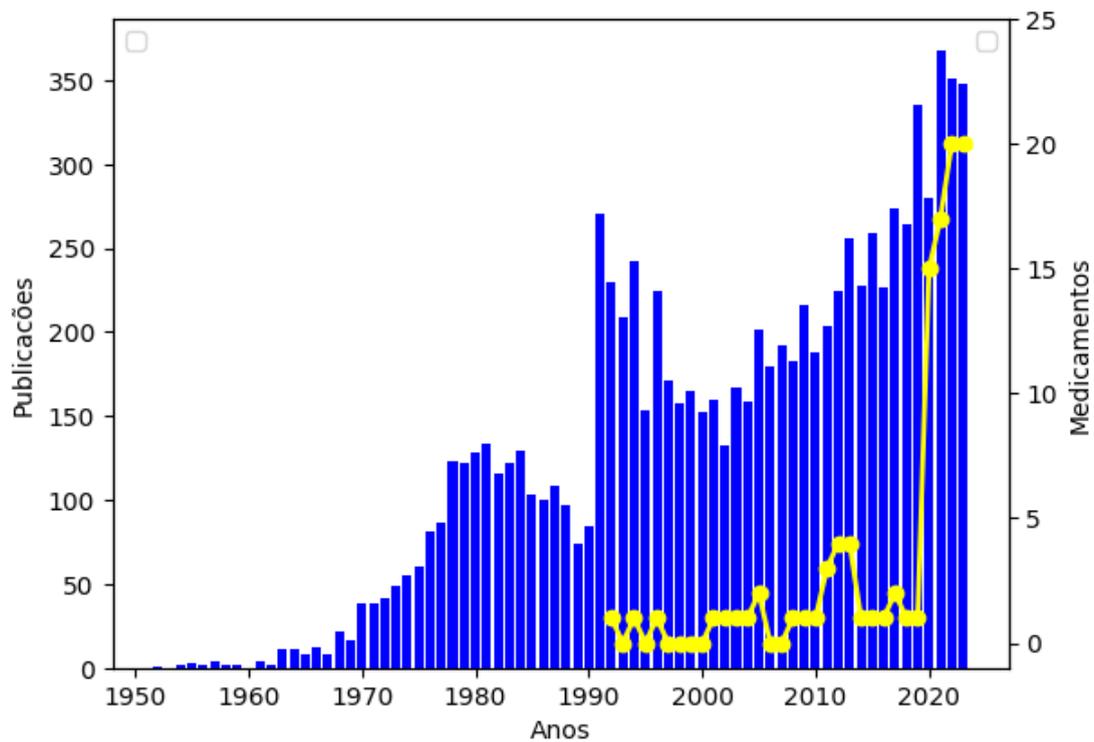
Figura 2.1.1 Perspectiva cronológica de estudos acerca das N-nitrosaminas.



Fonte: elaborada pela autora nas plataformas Canva e BioRender.

Ao realizar uma pesquisa utilizando a palavra-chave “*nitrosamines*” na base de dados *Web of Science*, por exemplo, foi observado um crescimento significativo no número de publicações (azul) ao longo dos anos, principalmente ao se associar a palavra chave com a palavra “*medicines*” (amarelo) (Figura 2.1.2).

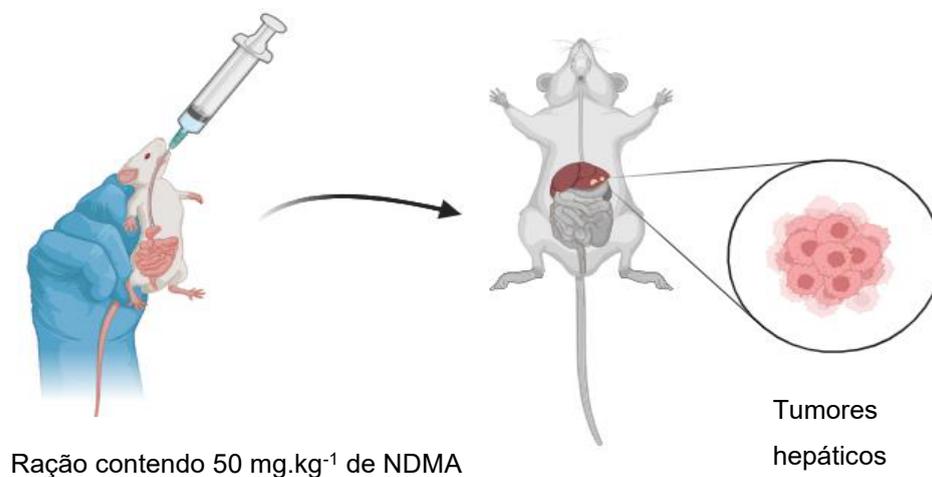
Figura 2.1.2 - Evolução nas publicações com a palavra-chave “nitrosamines” e “medicines”.



Fonte: Adaptada do *Web of Science*.

Segundo um levantamento bibliográfico dos autores Aglio *et al.*, no período de 1950 a 1956, os pesquisadores Magee e Barnes investigaram e constataram os efeitos toxicológicos das N-nitrosaminas pela exposição de NDMA através da alimentação de roedores. Nesse estudo, houve a indução de tumores hepáticos nos animais que foram submetidos a uma dieta contendo 50 mg.kg^{-1} durante um período menor que um ano (Figura 2.1.3) ^{13, 20, 21}.

Figura 2.1.3 - Representação do experimento realizado em roedores por Magee e Barnes.



Fonte: elaborada pela autora na plataforma BioRender.

Ainda segundo Aglio *et al.* em 1957 a 1962, na Noruega, foi observado que animais alimentados com ração de peixe enriquecida por nitritos também apresentaram desordens hepáticas e câncer. Durante as investigações, foi revelado que a ração estaria contaminada pela presença de NDMA. A constatação de que as N-nitrosaminas poderiam ser formadas pela reação de aminas e nitrito levou à hipótese de que esses compostos potencialmente carcinogênicos poderiam estar presentes em uma variedade de produtos de consumo humano, o que foi confirmado ao longo dos anos ^{13, 18, 22}.

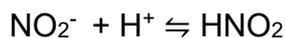
Em 1972, Lijinsky *et al.* identificaram a possível formação dessas substâncias *in vivo* pela ingestão de alimentos ricos em nitrito (vegetais, alimentos processados, carnes curadas, queijo) associados à IFAs contendo aminas terciárias. Para isso, IFAs de aminofenazona e oxitetraciclina foram incubadas com nitrito de sódio em condições fisiológicas (37°C, pH de 3,5 a 5,5) e determinadas as concentrações de N-nitrosaminas no meio reacional. Este ensaio resultou na produção de 73% e 65% de NDMA para cada IFA, respectivamente ^{13, 23, 24, 25}.

Lijinsky *et al.* continuaram aprofundando seus estudos sobre as reações de nitrosação em outros IFAs, incluindo clorfeniramina, metapirileno, clorpromazina, dextropropoxifeno, tolazamida, quinacrina, lucantona, ciclizina, dissulfiram e a metadona. Apesar das concentrações relativamente baixas de NDMA observadas nos ensaios, os autores reforçaram a possibilidade de desenvolvimento de câncer de estômago devido ao consumo prolongado e concomitante à uma alimentação rica em nitritos ^{13, 23, 24}.

Conforme indicado por Swan em 1975, as N-nitrosaminas são predominantemente absorvidas pelo sistema gastrointestinal e, em menor grau, pela pele. Além disso, elas requerem ativação metabólica para exercerem sua ação mutagênica e carcinogênica ^{26, 27}.

Anos depois, Eisenbrand *et al.* (1979) detectaram N-nitrosaminas em 68 medicamentos contendo aminofenazona, alertando mais uma vez para o risco crônico de exposição às impurezas ¹³.

Aglio *et al.* também cita que em 1985, Akintonwa apresentou possíveis mecanismos de formação de N-nitrosaminas *in vivo*. Para ele, a flora bacteriana do trato intestinal e da bexiga poderiam ter influência na redução do nitrato a nitrito, mediado pela nitrato redutase. Depois, o nitrito seria protonado formando ácido nitroso e anidrido nitroso ¹³, segunda as reações:



Desta forma, o anidrido nitroso atuará como espécie nitrosante e reagirá com a amina para formar a N-nitrosamina ¹³.

Nesse cenário de crescente interesse nos impactos das N-nitrosaminas no desenvolvimento de câncer em humanos, a IARC realizou uma série de reuniões, dentro do período de 1966 a 1991, dedicadas ao tema ²⁷.

A partir desses encontros e, com o reconhecimento da agência, algumas medidas puderam ser discutidas para que houvesse a redução das impurezas em alimentos e bebidas. Inicialmente, as indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas pareciam ter controlado efetivamente os meios de contaminação a partir da implementação de substituições de compostos nitrosados por alternativas mais seguras, também precavendo contra o uso simultâneo de agentes nitrosantes.

Em 2018, a problemática referente às N-nitrosaminas em insumos farmacêuticos ativos, particularmente na classe das "sartanas", ganhou notoriedade após a FDA notificar uma falha grave no controle de impurezas em IFA de valsartana, fabricada pela empresa Zhejiang Huahai Pharmaceutical ¹³. Esta descoberta desencadeou uma série de *recalls* de medicamentos, intensificando a atenção sobre a presença dessas impurezas ²⁸.

As "sartanas" desempenham um papel essencial na produção de fármacos destinados ao tratamento de condições crônicas, como hipertensão arterial e diabetes *mellitus* tipo 2. Devido à natureza crônica dessas doenças, os consumidores são frequentemente expostos a esses medicamentos por períodos prolongados, tornando crucial a vigilância rigorosa de impurezas.

A gravidade da situação levou agências regulatórias do mundo todo a tomarem medidas imediatas para conter os danos e, conseqüentemente, avaliar outros IFA de sartanas, levando as investigações subsequentes a constatar a presença de nitrosaminas em losartana, candesartana, olmesartana e ibersartana ²⁸.

No Brasil, o mesmo cenário se repetiu com a ação da ANVISA inspecionando e efetuando 31 ações sanitárias que envolveram interdições, suspensão de fabricação, distribuição, comercialização e recolhimento de lotes de medicamentos com suspeita de contaminação ²⁹.

Atualmente, também já foi constatado que outro meio de contaminação por N-nitrosaminas é via a degradação de produtos acabados, como é o caso da ranitidina que, segundo a ANVISA, pode haver influência da morfologia do cristal da molécula¹⁸.

Adicionalmente, as embalagens de medicamentos também já foram associadas à presença de NDMA e NDEA, devido às reações que ocorrem entre as aminas das tintas de impressão e a nitrocelulose presente nas folhas de vedação das embalagens. Com a alta temperatura durante o processo de selagem, as nitrosaminas podem volatilizar e contaminar os produtos farmacêuticos da embalagem^{18, 30}.

Esses eventos destacam a importância crítica de rigorosos controles de qualidade na produção farmacêutica e ressaltam a necessidade de medidas preventivas para garantir a eficácia e, acima de tudo, a segurança dos medicamentos.

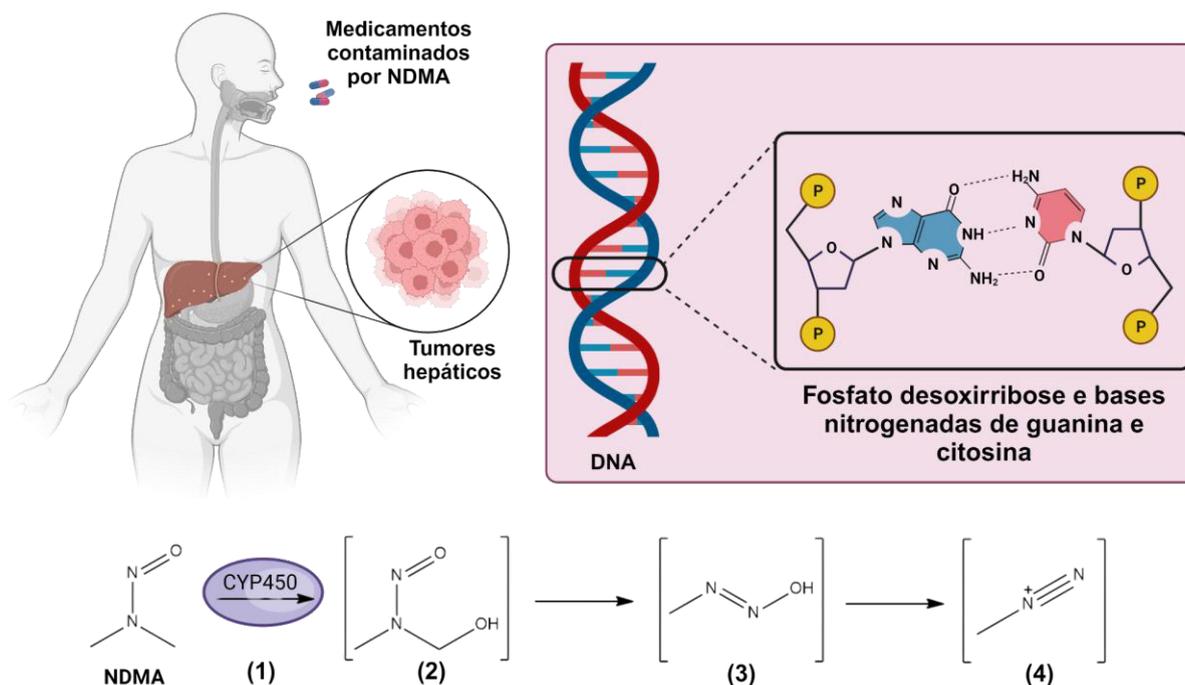
2.2 Exposição prolongada às N-nitrosaminas

Quando se trata dos mecanismos de ação das N-nitrosaminas no DNA e dos riscos para a saúde humana, essas substâncias são reconhecidas por causarem danos ao material genético. Isso ocorre devido à alquilação das bases nitrogenadas do DNA, corroborando para mutações pontuais, deleções ou inserções que comprometem a integridade do genoma e aumentam a propensão das células a se transformarem de maneira maligna.

Pesquisas indicam que, para desencadear as reações mutagênicas, as N-nitrosaminas dependem da bioativação promovida por enzimas monooxigenases do sistema microsomal P450 (CYP450) no fígado humano, como mostrado na Figura 2.2.1 (1)^{18,31}. Esse processo envolve a hidroxilação do carbono α da nitrosamina (NDMA), resultando na formação de α -hidroxi-NDMA (2), um intermediário mutagênico que se decompõe rapidamente, originando outras duas espécies reativas: formaldeído e alquildiazohidróxido (3)^{31,18}.

Subsequentemente, a oxidação do aldeído resulta na formação de ácido fórmico e, posteriormente, CO₂. Simultaneamente, a partir do alquildiazohidróxido, ocorre a formação do íon alquildiazônio (4), que serve como precursor de carbocátions. Estes últimos, apresentam caráter eletrofílico, e são suscetíveis a atacar os sítios nucleofílicos das bases nitrogenadas do DNA, alquilando-as. Outro destino possível para o alquildiazohidróxido, é o processo de solvatação, no qual é produzido metanol (MeOH)^{18,31}.

Figura 2.2.1 - Representação da ação do NDMA no DNA.



Fonte: elaborada pela autora na plataforma BioRender.

Yupeng Li *et al.* ainda citam um estudo realizado *in vitro* no qual, marcando isotopicamente os nitrogênios (^{15}N) da nitrosamina, foi monitorada a interação entre enzimas P450 e NDMA. Ao longo do experimento, foi constatado que cerca de 33% a 67% de NDMA foram metabolizados a α -hidroxi-NDMA ³¹.

Atualmente, segundo reportado no “Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em IFA e Medicamentos”, estudos apontam que de 228 nitrosaminas avaliadas, 82% apresentaram carcinogenicidade em animais *in vivo* independente da via de administração ¹⁸.

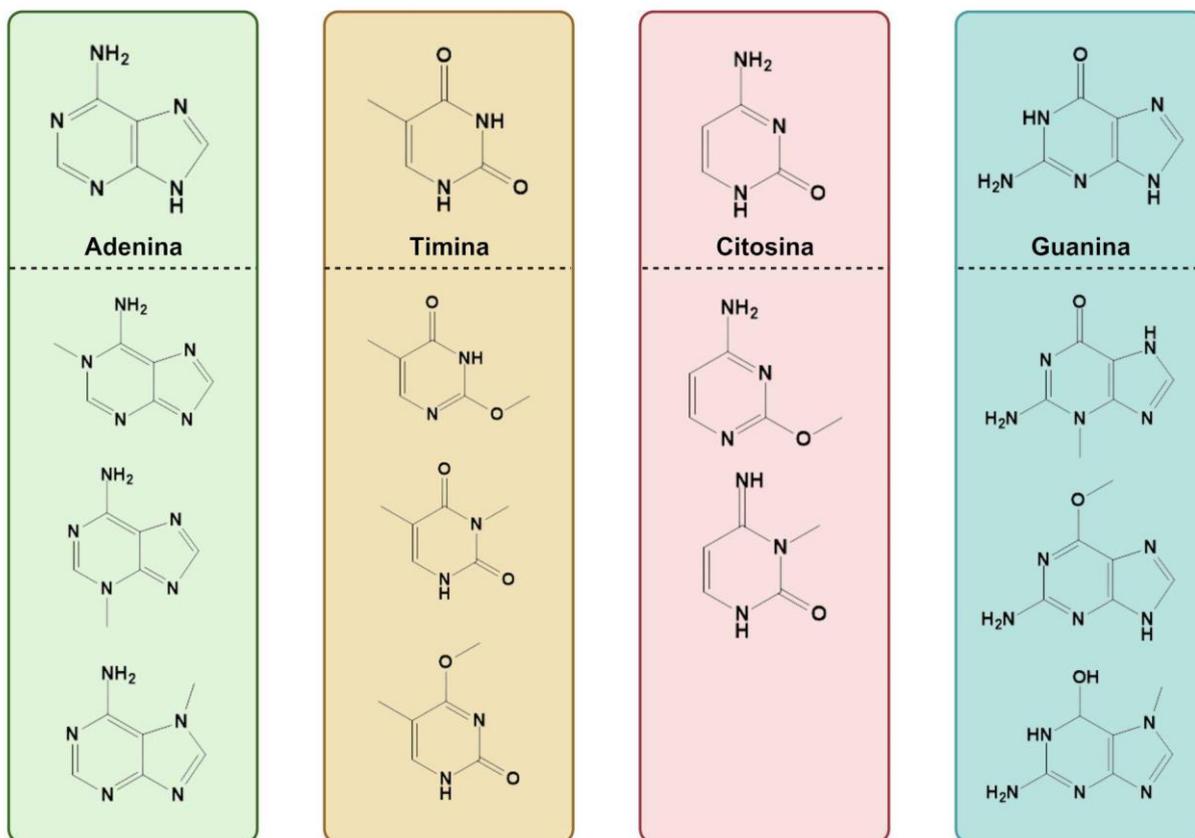
Nesse contexto, a exposição prolongada às impurezas de N-nitrosaminas em seres humanos está ligada a uma acumulação de danos no nível genético. Os adutos resultantes podem perturbar os processos normais de reparo do DNA, promovendo mutações e instabilidade genômica (Figura 2.2.2) ³¹.

Aliada à formação de adutos, segundo Bharate, as N-nitrosaminas também são conhecidas por causar mutações no gene p53, que por sua vez é responsável pela regulação no ciclo de crescimento celular do corpo humano. Deste modo, as células que foram danificadas em seu DNA, poderiam continuar se dividindo e crescendo de maneira desordenada, corroborando para o crescimento de células tumorais ³².

Além disso, segundo Yupeng Li *et al.*, a ativação de vias de sinalização celular

pró-inflamatórias e pró-oxidativas podem agravar os efeitos deletérios, contribuindo para o desenvolvimento e progressão de neoplasias.

Figura 2.2.2 - Bases nitrogenadas e seus respectivos adutos formados pela presença de NDMA.



Fonte: adaptado de Yupeng Li *et al.* ³¹.

Considerando os potenciais riscos envolvidos, agências como a EMA, a FDA e a ANVISA têm implementado medidas para reduzir os impactos da exposição prolongada às N-nitrosaminas presentes em medicamentos.

Uma diretriz de referência para as ações que foram adotadas pelas agências é o “Guia Harmonizado do ICH M7(R1)”. Este ofereceu orientações sobre o gerenciamento de riscos associados a impurezas reativas ao DNA, para limitar os riscos carcinogênicos em potencial ^{13,33}.

2.3 Aspectos legislativos e as ações da farmacovigilância

Segundo as orientações do "Guia Harmonizado", para as substâncias as quais ainda não havia evidências claras para determinar seu grau de periculosidade ou, àquelas quando ainda não se poderia afirmar um baixo risco de carcinogenicidade,

aplicava-se o conceito de "Limiar de Preocupação Toxicológica" (TTC, *Threshold of Toxicological Concern*). Nesses casos, foi estabelecida uma dosagem de 1,5 µg/pessoa/dia como ingestão aceitável (IA, *Acceptable Intake*), garantindo que não houvessem riscos para a saúde humana. ^{13,18,33}.

Entretanto, apesar dessa abordagem poder ser utilizada para impurezas mutagênicas presentes em medicamentos para tratamentos crônicos, e para quando não se houver dados disponíveis sobre carcinogenicidade, ela não poderia ser aplicada para as N-nitrosaminas por se tratarem de agentes com maior potencial genotóxico carcinogênico e pertencentes ao "Grupo de Preocupação" (*Cohort of Concern*) ¹⁸. Neste caso, seriam necessários estudos mais aprofundados para a determinação de um limite de ingestão aceitável, de modo que era esperada uma dose de ingestão aceitável significativamente menor que para as demais impurezas.

Para as N-nitrosaminas, esse limite deveria ser estabelecido caso-a-caso, utilizando dados de carcinogenicidade em animais e/ou de relação estrutura-atividade (SAR, *Structure Activity Relationship*), conforme orientado no Guia ICH M7 (R1) ^{13, 18, 33}.

Atualmente, as Dosagens Máximas Diárias (DMD), específicas para cada impurezas de N-nitrosaminas, são descritas na Tabela 1 ¹⁸:

Tabela 1. Limite individual de ingestão diária para N-nitrosaminas presentes em medicamentos.

N-nitrosamina (Sigla)	CAS	IA (ng/dia)
NDMA	62-75-9	96,0
NDEA	55-18-5	26,5
EIPNA	16339-04-01	26,5
DIPNA	601-77-4	26,5
NMBA	61445-55-4	96,0
NDBA	924-16-3	26,5
MeNP	16339-07-4	26,5
NDPA	621-64-7	26,5
NMOR	59-89-2	127,0
NNV	-	37,0
NMPH	55557-03-4	1300
NPIP	100-75-4	1300
NDLX	2680527-91-5	100
NTTP	-	37
NMPA	614-00-6	34,3

Fonte: ANVISA ¹⁸

Outro caso é para os medicamentos nos quais foram detectadas a presença concomitante de mais de uma N-nitrosamina no mesmo produto. Considerando este cenário, haveria duas alternativas as quais as empresas poderiam proceder para a definição de um limite de ingestão aceitável:

1. A soma de todas as impurezas de N-nitrosaminas não deveria ultrapassar o limite de aceitação referente à N-nitrosamina mais potente presente.
2. Os limites individuais de cada N-nitrosamina deveriam ser ajustados para assegurar que o risco total da exposição não exceda a razão estabelecida pelo Guia ICH M7 (R1) de 1:100000.

No que se refere às ações tomadas pelas agências reguladoras, a FDA adotou limites aceitáveis provisórios para se basear no monitoramento dos medicamentos da classe das “sartanas”. Esses valores foram obtidos a partir das orientações propostas pelo Guia ICH M7 (R1) ¹³.

A FDA também fez recomendações para que os medicamentos que apresentassem uma DMD inferior a 880 mg/dia, tivessem o limite total de 0,03 ppm, uma vez que a AI de 26,5ng não seria excedida ¹³. Por outro lado, segundo Aglio *et al.*, em casos aos quais a DMD fosse superior, o valor deveria ser ajustado conforme as recomendações do Guia ICH M7 (R1) para que a AI não fosse ultrapassada (Tabela 2) ¹³.

Tabela 2. Limite aceitáveis provisórios para NDMA, NDEA e NMBA em sartanas adotados pela FDA.

IFA	DMD (mg.dia ⁻¹)	NDMA		NDEA		NMBA	
		AI (ng.dia ⁻¹)	Limite (ppm)	AI (ng.dia ⁻¹)	Limite (ppm)	AI (ng.dia ⁻¹)	Limite (ppm)
Valsartana	320	96	0,30	26,5	0,083	96	0,30
Losartana	100	96	0,96	26,5	0,27	96	0,96
Irbesartana	300	96	0,32	26,5	0,088	96	0,32
Azilsartana	80	96	1,20	26,5	0,33	96	1,2
Olmesartana	40	96	2,40	26,5	0,66	96	2,4
Eprosartana	800	96	0,12	26,5	0,033	96	0,12
Candesartana	32	96	3,0	26,5	0,83	96	3,0
Telmisartana	80	96	1,2	26,5	0,33	96	1,2

Fonte: Aglio et al. ¹³.

Outra ação que a FDA determinou para as indústrias farmacêuticas, foi uma avaliação de risco dividida em três etapas ¹³.

1. Determinação do risco de formação e/ou presença de N-nitrosaminas nos IFAs comercializados e produtos acabados.
2. Confirmação da presença de N-nitrosaminas nos produtos, realizada apenas se fosse constatada a presença das impurezas na primeira etapa.
3. Envio das alterações implementadas à FDA para a prevenção ou redução da presença de N-nitrosaminas nos produtos avaliados.

Para a terceira etapa da avaliação de risco, foi exigido pela agência o uso de métodos analíticos validados com limites de quantificação $\leq 0,03$ ppm ou com capacidade de quantificar N-nitrosaminas considerando AI de 26,5 ng/dia.

Em 2019, a própria FDA chegou a publicar metodologias validadas para análises de N-nitrosaminas em IFAs e produtos acabados de Valsartana. Os métodos consistiam no uso desde a técnica de cromatografia gasosa acoplada à

espectrometria de massas (CG/MS) utilizando injetor *HeadSpace* à extração por solventes e injeção líquida em CG/MS (Figura 2.3) ^{36,37}.

Figura 2.3 - Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas com injetor de HeadSpace



Fonte: Shimadzu

Já as ações da EMA, segundo levantamento bibliográfico de Aglio *et al.*, consistiram em diversos *recalls* e publicações de guias informativos sobre a presença das impurezas nos medicamentos. Além disso, a EMA também adotou os mesmos limites provisórios que a FDA, entretanto, também criaram um Grupo de Trabalho de Segurança (SWP, *Safety Working Party*) para avaliar dados toxicológicos experimentais de outras diversas N-nitrosaminas.

A partir desse grupo, foi constatado que, em relação à EIPNA, NMBA e DIPNA não se haviam dados o suficiente na literatura da época para se determinar um *AI* específico para essas impurezas. Portanto, foi utilizado o método *SAR* proposto pelo Guia ICH M7 (R1) para se estimar o *AI* baseando-se na similaridade da estrutura e formação de íons alquildiazônicos por biotransformação da NDMA e NDEA ^{13, 33}.

Em 2019, a EMA também publicou um documento requerendo uma avaliação de risco sobre a presença de N-nitrosaminas em medicamentos. Em casos positivos para a presença das impurezas, os titulares de registro dos produtos deveriam notificar as autoridades para que ações corretivas fossem tomadas. Desde então, a EMA vem atualizando suas orientações e procedimentos, detalhando cada vez mais as abordagens pertinentes à avaliação de risco, de modo que produtos medicinais biológicos também fizessem parte das avaliações, além dos IFA quimicamente sintetizados ¹³.

O documento EMA/425645/2020 ¹³, por exemplo, é um guia que contém 3 passos tais quais as etapas estabelecidas pela FDA. Porém, adicionalmente, foram estipulados prazos para a realização das avaliações de risco bem como foram

considerados cenários com orientações específicas aos procedimentos que deveriam ser tomados diante de intervalos de concentrações encontradas das impurezas nos medicamentos.

No Brasil, as ações da ANVISA também estavam alinhadas às da EMA e FDA. Desde o comunicado divulgado em 2018, a agência vem monitorando e reportando níveis considerados inaceitáveis em medicamentos à base de “sartanas”.

Foi publicado pela ANVISA, no dia 17 de maio de 2018 a RDC 283/2019, que dispõe sobre investigação, controle e eliminação de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em antagonistas de receptor de angiotensina II ^{13, 34}. Com ela, ficou estabelecido que as empresas farmacêuticas produtoras, fracionadoras e distribuidoras de IFA's ou de medicamentos, deveriam comprovar por meio de ensaios validados, de acordo com a RDC 166/2017 ³⁵, a ausência de NDEA, NDMA, NDIPA, NMBA e EIPNA nos IFAs utilizados para a fabricação dos produtos com especificação para N-nitrosaminas ³⁴. Além disso, a RDC 283/2019 também determina quais processos, obrigatoriamente, deveriam passar por uma avaliação de risco, nela são contemplados a pureza de reagentes; solventes e sua reutilização; degradação de materiais e contaminação cruzada entre processos. Quanto aos prazos estabelecidos, havendo a possibilidade de contaminação, as empresas deveriam adotar, em até 60, 120 ou 180 dias ³⁴:

- I. Metodologias validadas nos termos na RDC n° 166/2017 ou Guia Q2 do ICH.
- II. Incluir ensaios de quantificação de N-nitrosaminas no controle de qualidade dos IFAs.
- III. Estabelecer especificações das impurezas para a liberação de lote do IFA, conforme os limites provisórios adotados pela FDA, ou limites provisórios apropriados caso fosse constatada a presença de mais de uma N-nitrosamina ou de uma não citada anteriormente pela resolução.

Caso fossem identificadas impurezas acima do limite provisório, os mesmos adotados pela FDA e EMA, as empresas deveriam suspender imediatamente a fabricação, distribuição, comercialização, o uso e manipulação dos medicamentos com o IFA - além de notificar a ANVISA em até 48h ³⁴.

Ao longo do tempo, conforme os estudos foram se aprofundando, houveram diversas alterações nas legislações aplicadas, contribuindo para que o controle de qualidade de medicamentos se tornasse mais rigoroso.

Em 2019, a ANVISA chegou a suspender a importação, comercialização e o uso da ranitidina por meio da RE 3.259/2020. Além dessa medida, estima-se o recolhimento voluntário de 255 medicamentos comercializados no Brasil ¹⁸.

Em 2020, foi lançado o “Programa Especial de Monitoramento de Nitrosaminas em Medicamentos” com a participação de grupos como a Gerência de Laboratórios de Saúde Pública (GELAS), Gerência-Geral de Medicamentos e Produtos Biológicos (GGMED), Gerência de Inspeção e Fiscalização de Medicamentos e Insumos Farmacêuticos (GIMES/GGFIS), e Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fiocruz ¹³. No programa, as empresas poderiam ter seus IFAs avaliados voluntariamente para quando obtivessem os resultados, pudessem adotar medidas de redução de impurezas de N-nitrosaminas, se necessário ¹³.

Em julho de 2021, a ANVISA publicou a primeira versão do “Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos”, no qual também eram disponibilizadas as recomendações quanto às alterações pós-registros, como mudanças relacionadas ao IFA, à composição e à embalagem de disposição final dos produtos acabados. Atualmente, o “Guia” foi revisado e está em sua terceira versão, contando com a contribuição de empresas e novos estudos realizados nos últimos anos por agências regulatórias internacionais ¹⁸.

Em abril de 2022, a ANVISA também publicou a RDC Nº 677, que por sua vez dispõe sobre as regras das avaliações de risco e o controle de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em IFA sintéticos, semissintéticos e medicamentos de uso humano.

2.4 Controle de qualidade

2.4.1 Desenvolvimento e validação de métodos analíticos

Segundo o “Guia de Validação e Controle de Qualidade Analítica” do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o objetivo de uma validação analítica é garantir a qualidade metrológica dos resultados analíticos, proporcionando rastreabilidade, comparabilidade e confiabilidade estatística que possam corroborar em tomadas de decisões ³⁵.

As validações analíticas, portanto, consistem em uma metodologia sistemática, por meio de ensaios experimentais, que confirmam e fornecem evidências objetivas e fidedignas de que os requisitos especificados para sua finalidade sejam atendidos ³⁵.

2.4.1.1 Parâmetros para uma validação analítica

Segundo a Resolução da Diretoria Colegiada N° 166, de 24 de julho de 2017, publicada pela ANVISA, pertencente ao Ministério da Saúde, as definições dos critérios de avaliação para uma validação analítica são as seguintes ³⁶:

2.4.1.1.1 Seletividade

“Capítulo IV, Seção I, Art. 19 A seletividade do método analítico deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz” ³⁶.

2.4.1.1.2 Linearidade

“Capítulo IV, Seção II, Art. 23 A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra ³⁶.

Art. 24 Uma relação linear deve ser avaliada em toda a faixa estabelecida para o método ³⁶.

Art. 25 Para o estabelecimento da linearidade, deve-se utilizar, no mínimo, 5 (cinco) concentrações diferentes da substância química de referência (SQR) para as soluções preparadas em, no mínimo, triplicata” ³⁶.

2.4.1.1.3 Efeito Matriz

“Efeito matriz é um estudo de seletividade que objetiva averiguar possíveis interferências causadas pelas substâncias que compõem a matriz amostral, gerando, basicamente, fenômenos de diminuição ou ampliação do sinal instrumental ou resposta instrumental” ³⁵.

“Capítulo IV, Seção III, Art. 29 O efeito matriz deve ser determinado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com a SQR do analito em solvente e com a amostra fortificada com a SQR do analito”

³⁶.

2.4.1.1.4 Precisão

“Capítulo IV, Seção V, Art. 33 A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado” ³⁶.

“Art. 34 A precisão deve ser expressa por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade” ³⁶.

2.4.1.1.5 Exatidão

“Capítulo IV, Seção VI, Art. 42 A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro. Art. 43 A exatidão deve ser verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método analítico, ou seja, 3 (três) concentrações: baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas em cada nível” ³⁶.

2.4.1.1.6 Limite de Detecção

“Capítulo IV, Seção VII, Art. 49 Limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas” ³⁶.

“Art. 50 A determinação do limite de detecção pode ser realizada por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração, considerando-se as particularidades do método analítico utilizado” ³⁶.

2.4.1.1.7 Limite de Quantificação

“Capítulo IV, Seção VIII, Art. 55 O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas” ³⁶.

“Art. 56 O limite de quantificação deve ser coerente com o limite de especificação da impureza” ³⁶.

2.4.1.1.8 Robustez

“Capítulo IV, Seção VIII, Art. 61 A robustez é um parâmetro tipicamente realizado no desenvolvimento do método analítico que indica a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas”³⁶.

2.5.1 Métodos analíticos

No que concerne às metodologias analíticas utilizadas para o monitoramento e controle de N-nitrosaminas, é de extrema importância que elas sejam desenvolvidas a partir de avaliações físico-químicas dos analitos de interesse e que também sejam considerados os parâmetros de sensibilidade e seletividade para a determinação quantitativa de baixas concentrações desses contaminantes.

Nesse sentido, o preparo de amostra é um fator determinante para a execução das análises subsequentes, isto porque nesta primeira etapa é possível realizar a extração e concentração dos analitos de interesse bem como a retirada de interferentes que podem estar presentes na matriz³⁷.

Dessa forma, visando reduzir o efeito de matriz, métodos de preparo de amostra a partir da destilação a vácuo, extração em fase sólida (SPE, Solid Phase Extraction) e extração por solvente (LLE, Liquid-Liquid Extraction) são comumente utilizadas³⁷. Para a LLE, os solventes mais utilizados para a extração de N-nitrosaminas são o diclorometano, metanol ou acetona. Já para a SPE, o carvão ativado é o sorvente mais utilizado em relação à fase reversa^{13, 38, 39}.

Por outro lado, também se espera que o preparo de amostra seja o mais simples possível, de modo a contribuir para a agilidade dos processos analíticos, reduzir a produção de resíduos químicos e, concomitantemente, evitar erros relacionados a diversas etapas de preparo de amostra⁴⁰.

Considerando as características físico-químicas das N-nitrosaminas como analitos de interesse em IFA ou medicamentos, é possível dividi-las como compostos voláteis e não voláteis. Conseqüentemente, haverá métodos analíticos mais pertinentes para cada uma delas¹³.

As N-nitrosaminas voláteis apresentam baixa massa molar, alta pressão de vapor e são compostos apolares, desta forma, podendo ser desprendidas mais facilmente da matriz amostral por destilação ou pelo uso do injetor de HeadSpace acoplado à técnica de cromatografia a gasosa¹³.

Métodos analíticos validados como o “*Combined Headspace NDMA, NDEA, NEIPA, and NDIPA Impurity Assay by GC-MS/MS*”, disponibilizado pela FDA ⁴¹, contornam muito bem o problema do efeito de matriz a partir do uso de injeção por *HeadSpace*.

Este tipo de metodologia, além de apresentar um preparo de amostra bastante simplificado, no qual apenas se faz a adição de dimetilsulfóxido (DMSO) ao IFA, utiliza um tipo de injetor que corrobora para a diminuição do efeito matriz, bem como a redução de acúmulo de resíduos não voláteis no injetor e na coluna cromatográfica. Esta técnica de injeção promove o equilíbrio entre a amostra e o *HeadSpace* favorecendo a formação de analitos voláteis. Em seguida, os componentes voláteis da amostra são extraídos da porção não volátil e seguem em direção ao fluxo gasoso que passará pelo processo de separação na coluna e, no exemplo citado, detecção pelo espectrômetro de massas ⁴².

Em relação aos tipos de detectores para a determinação de N-nitrosaminas, foi constatado o uso majoritário da espectrometria de massas devido à sua maior versatilidade em relação aos detectores quimiluminescentes que, apesar de sua seletividade para o grupo N-N=O, não permitem uma aplicação abrangente para atender às determinações de diversos outros tipos de analitos ¹³.

No que tange às N-nitrosaminas não voláteis, elas apresentam características opostas, com baixa pressão de vapor, sendo constituídas por cadeias mais alongadas que também corroboram para o aumento da sua massa molecular. Nesse sentido, para essas impurezas foram desenvolvidos métodos analíticos que utilizassem da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS, Liquid Chromatography Mass Spectrometry) ⁴³.

Com o aprimoramento das interfaces de ionização, sendo elas a ionização química por pressão atmosférica (APCI, Atmospheric-pressure chemical ionization) e a ionização por eletronebulização (ESI, Electrospray Ionization), existem a vantagens de se realizar a determinação simultânea de N-nitrosaminas voláteis e não voláteis por cromatografia líquida ^{13, 39}.

Analitos como a NMBA, que apresenta um grupo carboxílico em sua extremidade, podem apresentar características físico-químicas incompatíveis com a CG-MS. Isso porque, podem sofrer degradação sob altas temperaturas. Nesse caso, por outras características físico-químicas da molécula como a alta polaridade e a

formação de ligações de hidrogênio, é possível se fazer o uso da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS).

Atualmente, com a descoberta de várias outras N-nitrosaminas, a aplicação de metodologias que possibilitem a detecção e quantificação simultânea de diferentes analitos se torna mais vantajosa. Isso confere às empresas maior agilidade nos processos de análise, emissão de laudos técnicos, fabricação de medicamentos e, conseqüentemente, comercialização de seus produtos. Nesse sentido, o uso das técnicas cromatográficas associadas a detectores como o espectrômetro de massas, têm ganhado cada vez mais força no mercado, uma vez que a combinação dessas técnicas pode proporcionar aos laboratórios métodos sensíveis, seletivos e robustos

43, 44 .

3 Considerações Finais

A trajetória das pesquisas sobre a presença de N-nitrosaminas em diferentes produtos de consumo humano, desde as pesquisas de Lijinsky *et. al* aos estudos de toxigenicidade, destaca a importância contínua de compreender e mitigar os riscos ligados a essas impurezas.

O comunicado recente sobre a presença dessas impurezas em medicamentos, especialmente nas "sartanas" em 2018, acendeu um alerta no mundo inteiro e evidenciou a necessidade de controles mais rigorosos na indústria farmacêutica.

A falta de métodos analíticos adequados para o controle de qualidade contínuo em medicamentos, dadas as complexidades de suas formulações, indicou mais uma vez a urgência de avanços científicos e tecnológicos. Apesar disso, a ação das agências reguladoras ao exigir a implementação de medidas e avaliações de risco pela indústria farmacêutica para rastrear e controlar possíveis vias de contaminação foi crucial para garantir a segurança da população.

A Anvisa, como reguladora sanitária nacional, desempenhou um papel crucial na participação da garantia de qualidade e segurança dos medicamentos. Ao estabelecer prazos para a realização de avaliações de riscos e disponibilizando Guias com orientações, a Agência além de conceder previsibilidade às empresas farmacêuticas nacionais, também contribuiu para que o mercado brasileiro se mantivesse alinhado ao internacional.

Segundo a Sindusfarma, a inclusão da ANVISA como membro no *Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme* (PIC/S) em 2020, está relacionada ao reconhecimento internacional de sua competência, colocando o Brasil como uma potência global em termos de Boas Práticas de Fabricação e Inspeções, trazendo benefícios para o comércio internacional de medicamentos ⁴⁵.

Em linhas gerais, conclui-se que a contínua colaboração entre indústria, agências reguladoras e instituições de pesquisa é fundamental para o avanço científico e tecnológico no que diz respeito ao controle de N-nitrosaminas, assegurando assim a confiança e a segurança dos consumidores em relação aos produtos farmacêuticos.

4 Referências Bibliográficas

- [1] IARC; **Some N-nitroso compounds**, IARC: Lyon, France, 1978.
- [2] FAPESP. **Morfina faz 200 anos**. 24 de maio de 2005. Disponível em: <<https://agencia.fapesp.br/morfina-faz-200-anos/3759>>. Acesso em: 03 de novembro de 2023.
- [3] DUARTE, D. F. **Uma breve história do ópio e dos opióides**. Revista Brasileira de Anestesiologia, v. 55, n. 1, p. 135–146, jan. 2005. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rba/a/jphPg6dLHxQJDsxGtgmhjJ>>. Acesso em: 03 de novembro de 2023.
- [4] **Nossa capa: Alexander Fleming e a descoberta da penicilina**. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v. 45, n. 5, p. I–I, out. 2009. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442009000500001>. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/jbpm/a/jY6NfbwqjkmQTbCdFBRbp4M>>. Acesso em: 05 de novembro de 2023
- [5] Inovação e Pesquisa. **Investimento em P&D pela indústria farmacêutica bate recorde em 2022**. 03 de maio de 2023. Disponível em: <<https://pifazacontecer.com.br/investimento-em-pd-pela-industria-farmaceutica-bate-recorde-em-2022/>>. Acesso em: 26 de novembro de 2023.
- [6] IQVIA *Institute for Human Data Science*. **Global Trends in R&D 2023 - Activity, Productivity and Enablers**. 15 de fevereiro de 2023. Disponível em: <<https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports-and-publications/reports/global-trends-in-r-and-d-2023>>. Acesso em: 26 de novembro de 2023.
- [7] Sindusfarma. **Perfil da indústria farmacêutica e aspectos relevantes do setor**. Disponível em: <https://sindusfarma.org.br/uploads/files/229d-gerson-almeida/Publicacoes_PPTs/PERFIL_IF_2023.pdf>. Acesso em: 16 de novembro de 2023.
- [8] Interfarma. **A indústria farmacêutica segue crescendo em ritmo acelerado**. 24 de abril de 2020. Disponível em: <<https://www.interfarma.org.br/industria-farmaceutica-segue-crescendo-em-ritmo-acelerado/>>. Acesso em: 11 de novembro de 2023.
- [9] MORO, A.; INVERNIZZI, N. **A tragédia da talidomida: a luta pelos direitos das vítimas e por melhor regulação de medicamentos**. História, Ciências, Saúde-Manguinhos, v. 24, n. 3, p. 603–622, set. 2017.
- [10] Ministério da Saúde. **Talidomida**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/h/hanseniose/talidomida#:~:text=A%20Talidomida%20%C3%A9%20um%20medicamento,profissionais%20de%20sa%C3%BAde%20e%20pacientes>>. Acesso em: 10 de novembro de 2023.
- [11] BNDES. **Como surge um novo medicamento?**. Publicado em: 13 de abril de 2018. Disponível em: <<https://www.bndes.gov.br/wps/portal/site/home/conhecimento/noticias/noticia/novos-medicamentos-cgee>>. Acesso em: 11 de novembro de 2023.
- [12] ANVISA. **Registro de novos medicamentos: saiba o que é preciso**. 26 de novembro de 2018. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=5062720&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=registro-de-novos-medicamentos-saiba-o-que-e>

preciso&inheritRedirect=true#:~:text=Processo%20de%20aprova%C3%A7%C3%A3o,para%20posterior%20avalia%C3%A7%C3%A3o%20da%20Ag%C3%Aancia>.

Acesso em: 11 de novembro de 2023.

[13] AGLIO, T. DE C. *et al.* **N-Nitrosaminas Em Medicamentos: Um Problema Atual, Uma Realidade Antiga**. Química Nova, v. 45, n. 8, p. 959–976, ago.

2022. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170894>.

[14] ANVISA. **Anvisa participa de reunião das autoridades reguladoras de referência das Américas**. 12 de julho de 2023. Disponível em:

<<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2023/anvisa-participa-de-reuniao-das-autoridades-reguladoras-de-referencia-das-americas>>. Acesso em: 26 de novembro de 2023.

[15] ANVISA. **Insumos farmacêuticos**. Disponível em:

<<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/insumos>>. Acesso em: 15 de novembro de 2023.

[16] ANVISA. **Resolução RDC Nº 53, de 04 de dezembro de 2015** – Republicada no DOU nº 234, de 08 de dezembro de 2015. Disponível em: <

https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3295768/%282%29RDC_53_2015_COMP.pdf/3819ccd6-bed7-41a6-ae34-1f7fea41b5f7>. Acesso em: 24 de novembro de 2023.

[17] LEITE, F. **Impurezas de Degradação**. Qualidade Em Cromatografia

(Quali)/Ponto De Vista. Scientia Chromatographica, v. 63, n. 2, 2009. Disponível em: <

<<https://www.iicweb.org/scientiachromatographica.com/files/v1n2a5.pdf>> Acesso em:

25 de novembro de 2023.

[18] ANVISA. **Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos**

Farmacêuticos Ativos e Medicamentos. Guia nº 50/2021 - versão 3. Publicado em

12 de junho de 2023. Disponível

em:<https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6279847/Guia_50_vers%C3%A3o+3_12+06+23.pdf/fb31d2c8-16cc-4176-9578-bf85d9dea053>. Acesso em: 25 de novembro de 2023.

[19] Adriana, M. S. **Nitrosaminas e câncer: efeitos biológicos da carne curada**.

São Paulo, 2019. Disponível em:

<<https://repositorio.usp.br/directbitstream/14d04ddb-21ab-41d3-925f-f4b1e95b0f8a/3049624.pdf>>. Acesso em: 13/01/2024

[20] Magee, P., Barnes, J. **The Production of Malignant Primary Hepatic Tumours in the Rat by Feeding Dimethylnitrosamine**. *Br. J. Cancer* 10, 114–122 (1956).

<https://doi.org/10.1038/bjc.1956.15>.

[21] Barnes, J.M; Magee, P.N. **Some Toxic Properties of Dimethylnitrosamine**.

Occupational and Environmental Medicine. 1954;11. 167-174.

[22] Ender, F., Havre, G., Helgebostad, A. *et al.* **Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring**. *Naturwissenschaften* 51, 637–638 (1964).

<https://doi.org/10.1007/BF00623677>

[23] Lijinsky W. **Reaction of drugs with nitrous acid as a source of carcinogenic nitrosamines**. *Cancer Res*. 1974;34(1):255–8.

[24] Lijinsky, W.; Conrad E.; Van de Bogart, R. **Carcinogenic nitrosamines formed by drug-nitrite interactions**. *Nature*. 1972;239(5368):165–7.

[25] Keire, D.A., Bream, R., Wollein, U. *et al.* **Correction: International Regulatory Collaboration on the Analysis of Nitrosamines in Metformin-Containing Medicines**. *AAPS J* 24, 84 (2022). <https://doi.org/10.1208/s12248-022-00734-w>

[26] SWAN, P.F. **The toxicology of nitrate, nitrite and N- nitroso compounds**. *J. Sci. Food Agric.*, v.26, p.1771- 1783, 1975.

- [27] OCHS, S. M.; SANTANA, D. S; LIMA, C. P et al . **Riscos sobre a presença de impurezas de n-nitrosaminas e azidas em medicamentos**. R. Científica UBM - Barra Mansa (RJ), ano XXVII, v. 24, n. 47, 2. Sem. 2022 p.144-160.
- [28] EMA. **Nitrosamine impurities in human medicinal products** - EMEA/H/A-5(3)/1490. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emeah-a53-1490-assessment-report_en.pdf>. Acesso em: 22 dezembro de 2023.
- [29] ANVISA. **ANVISA determina recolhimento de lotes de anti-hipertensivo**. 27 de junho de 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-determina-recolhimento-de-lotes-do-anti-hipertensivo-losartana>>. Acesso em: 26 de novembro de 2023.
- [30] Nejc Golob, Rok Grahek, Malcolm Ross, Robert Roškar. **Nitrocellulose blister material as a source of N-nitrosamine contamination of pharmaceutical drug products**. International Journal of Pharmaceutics, Volume 618, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121687>.
- [31] Li Y, Hecht SS. **Metabolic Activation and DNA Interactions of Carcinogenic N-Nitrosamines to Which Humans Are Commonly Exposed**. International Journal of Molecular Sciences. 2022; 23(9):4559. <https://doi.org/10.3390/ijms23094559>
- [32] Bharate, Sonali S. **Critical Analysis of Drug Product Recalls due to Nitrosamine Impurities**. Journal of Medicinal Chemistry 2021 64 (6), 2923-2936. Publicação em 11 de março de 2011. Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02120>
- [33] ICH. **Assessment And Control Of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities In Pharmaceuticals To Limit Potential Carcinogenic Risk M7(R1)**. 31 de março de 2017. Disponível em: <<https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5945191/Guia+ICH+M7%28R1%29/4ccb926c-cd4f-4d90-b437-b94db2536c90> > Acesso em: 06 de janeiro de 2024
- [34] ANVISA - **Resolução RDC N° 283, de 17 de maio de 2019**. - Publicação (DOU) em 22 de maio de 2019. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-283-de-17-de-maio-de-2019-118357341>>. Acesso em: 06 de janeiro de 2024
- [35] Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Guia de validação e controle de qualidade analítica : fármacos em produtos para alimentação e medicamentos veterinários**. Brasília: Mapa/ACS, 2011. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/arquivos-publicacoes-laboratorio/guia-de-validacao-controle-de-qualidade-analitica.pdf>>.
- [36] Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Resolução RDC N° 166, de 24 de julho de 2017** – publicação (DOU) em 25 de julho de 2017. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401>. Acesso em: 06 de janeiro de 2024.
- [37] Jardim, I.C.S.F. **Extração em fase sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas**. Scientia Chromatographica, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.
- [38] Khaja Moinuddin Shaik, Bhaskar Sarmah, Gaurav Suresh Wadekar & Pramod Kumar (2022) **Regulatory Updates and Analytical Methodologies for Nitrosamine Impurities Detection in Sartans, Ranitidine, Nizatidine, and Metformin along with Sample Preparation Techniques**. Critical Reviews in Analytical Chemistry, 52:1, 53-71, DOI: 10.1080/10408347.2020.1788375
- [39] Maria Kristina Parr, Jan F. Joseph, **NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Volume 164, 2019, Pages 536-549, ISSN 0731-7085, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2018.11.010>.

- [40] SILVA, Luis Felipe da. **Desenvolvimento de novos materiais e dispositivos para preparo miniaturizado de amostras e seu acoplamento on-line com cromatografia líquida de alta eficiência**. 2020. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020. doi:10.11606/T.75.2020.tde-16032021-170051. Acesso em: 27 de janeiro de 2024.
- [41] FDA. **Combined Headspace N-Nitrosodimethylamine (NDMA), N-Nitrosodiethylamine (NDEA), N-Nitrosoethylisopropylamine (NEIPA), and N-Nitrosodiisopropylamine (NDIPA) Impurity Assay by GC-MS/MS**. Publicado em: 29 de abril de 2019. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/124025/download>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2024.
- [42] Wisut Wichitnithad et al. **Development of a Sensitive Headspace Gas Chromatography–Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Determination of Nitrosamines in Losartan Active Pharmaceutical Ingredients**. ACS Omega 2021 6 (16), 11048-11058. DOI: 10.1021/acsomega.1c00982
- [43] FDA. **Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Method for the Determination of NDMA in Ranitidine Drug Substance and Solid Dosage Drug Product**. Publicado em 17 de outubro de 2019.
- [44] AGILENT. **Nitrosamines Analysis in Drinking Water Using GC/MS/MS—Meeting Equivalence to EPA Method 521**. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-9224EN_Triple_Quadrupole_AppNote.pdf>. Acesso em: 11 de janeiro de 2024.
- [45] SINDUSFARMA. **Perfil da indústria farmacêutica e aspectos relevantes do setor em 2023**. Disponível em:< https://sindusfarma.org.br/uploads/files/229d-gerson-almeida/Publicacoes_PPTs/PERFIL_IF_2023.pdf>. Acesso em: 15 de dezembro de 2023.