

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

CAROLINA ROSSONI

**NITROSAMINAS EM INSUMOS FARMACÊUTICOS
ATIVOS**

SÃO CARLOS -SP
2024

CAROLINA ROSSONI

NITROSAMINAS EM INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal de São Carlos como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro.

São Carlos-SP
2024

Rossoni, Carolina

Nitrosaminas em insumos farmacêuticos ativos /
Carolina Rossoni -- 2024.
34f.

TCC (Graduação) - Universidade Federal de São Carlos,
campus São Carlos, São Carlos
Orientador (a): Renato Lajarim Carneiro
Banca Examinadora: Kleber Thiago de Oliveira, João
Paulo Scaramal
Bibliografia

1. Nitrosaminas. 2. Insumo farmacêutico ativo. 3.
Medicamentos. I. Rossoni, Carolina. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Ronildo Santos Prado - CRB/8 7325



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - DQ/CCET

Rod. Washington Luís km 235 - SP-310, s/n - Bairro Monjolinho, São Carlos/SP, CEP 13565-905

Telefone: (16) 33518206 - <http://www.ufscar.br>

DP-TCC-FA nº 4/2024/DQ/CCET

Graduação: Defesa Pública de Trabalho de Conclusão de Curso

Folha Aprovação (GDP-TCC-FA)

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLINA ROSSONI

NITROSAMINAS EM INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS

Trabalho de Conclusão de Curso

Universidade Federal de São Carlos - Campus São Carlos

São Carlos, 17 de janeiro de 2024

ASSINATURAS E CIÊNCIAS

Cargo/Função	Nome Completo
Orientador	Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro
Membro da Banca 1	Prof. Dr. Kleber Thiago de Oliveira
Membro da Banca 2	Dr. João Paulo Scaramal



Documento assinado eletronicamente por **Caio Marcio Paranhos da Silva, Professor(a)**, em 29/01/2024, às 14:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufscar.br/autenticacao>, informando o código verificador **1341116** e o código CRC **EC930337**.

Referência: Caso responda a este documento, indicar expressamente o Processo nº 23112.002225/2024-14

SEI nº 1341116

Modelo de Documento: Grad: Defesa TCC: Folha Aprovação, versão de 02/Agosto/2019

RESUMO

Desde 1972, as N-nitrosaminas têm sido alvo de estudo na composição de medicamentos. Contudo, em julho de 2018, a presença da nitrosamina NMDA foi identificada em Valsartanas, o que resultou no *recall* desse medicamento. Posteriormente, em agosto de 2018, houve também o *recall* de losartana e irbesartana. A partir desse marco, os estudos a cerca desses compostos orgânicos, que são caracterizados pela presença de um grupo amina ligada a um grupo nitroso, vem avançando constantemente, gerando revisões de órgãos regulatórios, visando a segurança ao consumidor. Com o intuito de evitar a escassez de medicamentos, foram desenvolvidos guias e resoluções para ajudar na avaliação e controle dos riscos, considerando os limites aceitáveis de ingestão diária. Como consequência, houve a necessidade de compreender as rotas de formação dessas impurezas durante o processo de fabricação dos farmoquímicos e dos medicamentos. Nesse sentido, o presente trabalho teve por objetivo avaliar as possíveis rotas de formação dessa impureza e como podemos determinar seus limites e avaliar se há o controle correto das nitrosaminas.

Palavras-chave: Nitrosaminas; Insumo farmacêutico ativo; Medicamentos.

ABSTRACT

Since 1972, N-nitrosamines have been the subject of study in medication composition. However, in July 2018, the presence of the N-nitrosamine NDMA was identified in Valsartan, leading to the recall of this medication. Subsequently, in August 2018, there were also recalls of Losartan and Irbesartan. Following this milestone, studies on these organic compounds, characterized by the presence of an amine group linked to a nitroso group, have been constantly advancing, prompting regulatory revisions aimed at consumer safety. To prevent medication shortages, guidelines and resolutions have been developed to assist in assessing and controlling risks, considering acceptable limits for daily intake. Consequently, there was a need to understand the pathways of formation of these impurities during the manufacturing process of both pharmaceuticals and medications. In this context, this study aimed to evaluate potential formation routes of these impurities and how we can establish their limits, assessing whether there is proper control over nitrosamines.

Keyword: Nitrosamines; Active pharmaceutical ingredient; Medicines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Nitrito de Sódio	11
Figura 2 - Marcos Regulatórios sobre as N-nitrosaminas	12
Figura 3 - Estruturas químicas de insumos farmacêuticos ativos (IFA) em medicamentos que apresentaram N-nitrosaminas	13
Figura 4 - Estrutura geral de N-nitrosaminas	16
Figura 5 - Reação geral da formação de uma N-nitrosamina	17
Figura 6 - Caminhos de formação de compostos N-nitrosos	20
Figura 7 - Compostos do tipo aminas suscetíveis à N-nitrosação	20
Figura 8 - Mecanismo de desalquilação da amina terciária	21
Figura 9 - Transformação de Nitrosamina NDMA em Diazônio por via de α -hidroxilação enzimática	22
Figura 10 - Ataque de Diazônio a base nitrogenada Guanina	23
Figura 11 - Pontes de Hidrogênio entre Guanina Alquilada e Timina, e entre Guanina 16 Alquilada e Citosina	23
Figura 12 - Representação estrutural de carbonos α e β em uma nitrosamina	26
Figura 13 - Triângulo CTD (ICH 4)	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rotas de formação de N-nitrosaminas e classificação de tipos de reações	18
Tabela 2 - Limites de aceitação para nitrosaminas	24
Tabela 3 - Contagem de átomos de hidrogênio em cada α -carbono (do menor número primeiro) e a pontuação de α -Hidrogênio correspondente	27
Tabela 4 - Lista de características de desativação e pontuações associadas .	28
Tabela 5 - Lista de características de ativação e pontuações associadas	29

LISTA DE SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
COIFA: Coordenação de Registro de Insumo Farmacêutico Ativo
CTD: *Common Technical Document*
CYP450: Citocromo P450
DIFA: Dossiê do Insumo Farmacêutico Ativo
DIPEA: N,N-diisopropiletilamina
EMA: *European Medicines Agency*
FDA: *Food and Drug Administration*
IARC - Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
ICH: *International Council for Harmonisation*
IFA: Insumo Farmacêutico Ativo
NEIPA: N-nitrosoetilisopropilamina
NDBA: N-Nitrosodibutilamina
NDEA: N-nitrosodietilamina/dietilnitrosamina
NDIPA: N-nitrosodiisopropilamina/di-isopropilnitrosamina
NDPA: N-nitrosodipropilamina
NDMA: N-nitrosodimetilamina
ng: Nanograma
NMBA: Ácido N-nitroso-N-metil-4-Aminobutírico
NMPA: N-Nitroso-N-Metilanilina
NPYR: 1-Nitrosopirrolidina
OMS: Organização Mundial de Saúde
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada
SAR: *Structure-Activity Relationship*
TD50: *Toxic Dose 50*
TEA: Trietanolamina
TTC: *Threshold of toxicological concern*

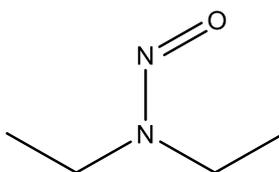
SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	METODOLOGIA	15
2.1	Instrumento e procedimento de coleta de dados	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	N-Nitrosaminas	16
3.2	Mecanismos de formação de nitrosaminas	19
3.3	Toxicologia, classificação e controle de nitrosaminas	22
3.4	Importância da análise do DIFA	29
4	CONSIDERAÇÃO FINAIS	33
	REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

A mais de 60 anos se tem o conhecimento da presença de compostos N-nitrosos, também chamados de nitrosaminas (nitrogênio do grupo nitroso ligado ao nitrogênio de uma amina), em alimentos que são tratados com nitrito de sódio, o qual tem funções de coloração, aromatizante e preservação. Desde aquele tempo existem estudos sobre o potencial carcinogênico desses compostos em animais, onde mais de 40 espécies foram tratadas com nitrosodietilamina (NDEA) e apresentaram susceptibilidades a ações carcinogênicas, o que sugeriu que não haveria espécies não susceptíveis. Outros estudos demonstraram que a quantidade, a frequência e a rota de administração para diferentes espécies poderiam alterar o efeito no organismo¹. A Figura 1 apresenta a nitrosamina NDEA.

Figura 1: dietilnitrosamina (NDEA)



Fonte: Autoria própria (2023).

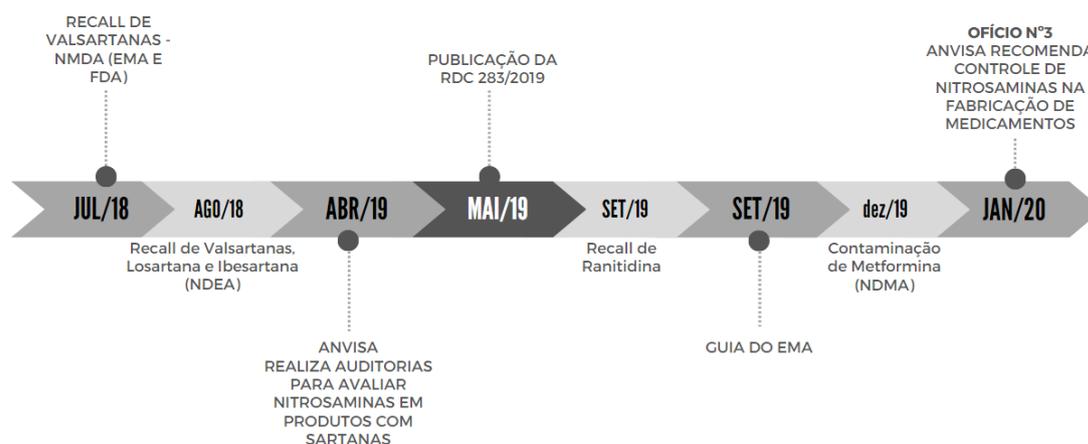
A constatação de nitrosaminas em medicamentos data de 1972², onde há relatos de possível formação de N-nitrominas *in vivo* pela ingestão de alimentos com agentes nitrosantes juntamente com o consumo de medicamentos com Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) contendo aminas terciárias na estrutura. Durante os estudos, as concentrações observadas de N-nitrosaminas formadas a partir de IFA eram baixas (aminofenazona foi a que gerou o maior percentual de NDMA - cerca de 40%), porém foi enfatizado o risco, se considerado que muitos dos medicamentos avaliados são consumidos de forma crônica pela maioria dos pacientes, podendo levar ao desenvolvimento de câncer. Diversos artigos foram lançados após o trabalho de Lijinsky et al., aumentando as evidências e a lista de medicamentos que apresentavam o risco de formação de nitrosaminas⁴.

Estudos epidemiológicos e experimentais demonstraram que as nitrosaminas estão associadas a vários tipos de câncer em animais e podem apresentar risco para os seres humanos. A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC)

classifica várias nitrosaminas como agentes carcinogênicos para humanos, incluindo a N-nitrosodimetilamina (NMDA) e a N-nitrosodiehanolamina (NDEA).

As nitrosaminas também estão presentes na água e em alimentos¹, mas se tornaram um alerta na área da saúde em produtos farmacêuticos só em 2018, depois de observado a presença de NDMA em Valsartana. Em 2019, a ANVISA realizou auditorias para avaliar nitrosaminas em produtos da classe das sartanas. Nesse mesmo ano foi publicado a RDC 283, de 17 de maio de 2019, que dispõe sobre investigação, controle e eliminação de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em antagonistas de receptor de angiotensina II (que são as sartanas), que posteriormente foi revogada pela 677, que dispõe sobre avaliação de risco e controle de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em Insumos Farmacêuticos Ativos (IFA) e medicamentos de uso humano (ANVISA). A Figura 2 apresenta uma linha do tempo do escopo regulatório.

Figura 2: Marcos Regulatórios sobre as N-nitrosaminas



Fonte: Autoria própria (2023).

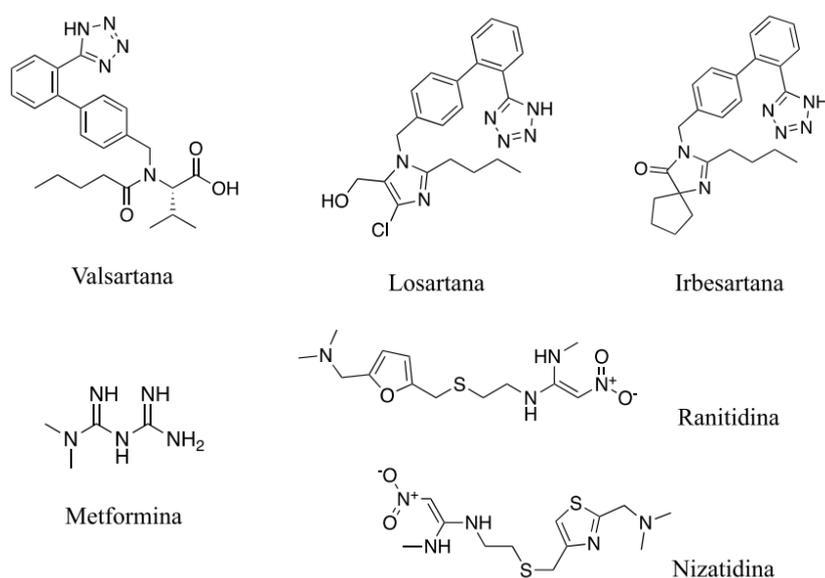
Em setembro de 2019 foi publicado o Guia do EMA (*European Medicines Agency* – Agência Europeia de Medicamentos), que trata sobre revisões científicas acerca do risco de impurezas de nitrosaminas em medicamentos humanos, orientação para titulares de autorização de introdução no mercado, tópicos direcionados aos principais fármacos da classe das sartanas e ranitidina, e outros assuntos pertinentes a nitrosaminas.

Em janeiro de 2020 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) emitiu o ofício n° 3, que trouxe recomendações cruciais para os fabricantes de

medicamentos no Brasil. Esse ofício enfatizou a importância do controle das nitrosaminas, destacando a necessidade de ações preventivas por parte das indústrias farmacêuticas.

Entre 2020 e 2022, só nos Estados Unidos, mais de 1.400 lotes de produtos foram recolhidos do mercado devido à presença de N-nitrosaminas acima de seu limite diário aceitável. Incluem-se nessa lista, medicamentos contendo os IFA valsartana, irbesartana, losartana, metformina, ranitidina e nizatidina (Figura 3)⁴.

Figura 3: Estruturas químicas de insumos farmacêuticos ativos (IFA) em medicamentos que apresentaram N-nitrosaminas



Fonte: Aglio *et al.* (2022).⁴

A RDC 677/2022 estabelece regras para avaliação de risco, execução de testes confirmatórios e controle de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em insumos farmacêuticos ativos (IFA) e medicamentos destinados ao uso humano.

O EMA vem atualizando seus guias constantemente e trazendo mais conhecimento sobre o assunto. Uma das atualizações recentes mais importantes foi a publicação, em julho de 2023, do apêndice 1: Ingestão aceitável estabelecida para N-nitrosaminas, possibilitando a categorização e definição de limites mais assertivos e, no caso de algumas nitrosaminas, mais abrangentes, para titulares e requerentes de autorizações para introdução de novos produtos no mercado.

O objetivo desta revisão de literatura é fornecer informações sobre um assunto

recente e muito importante na indústria farmacêutica, desde a entrada da matéria prima, até sua formulação e embalagem, dado que todos os processos podem oferecer risco de contaminação por nitrosaminas, composto com elevado potencial mutagênico e carcinogenicidade. O foco do trabalho será entender os mecanismos base de formação de nitrosaminas, além da avaliação da possibilidade de formação desses compostos no insumo farmacêutico ativo (IFA) através da análise do Dossiê do Insumo Farmacêutico Ativo (DIFA), que deve conter a análise de risco e, caso seja encontrado risco de formação, o Dossiê deve conter os métodos de controle, que devem estar adequados as legislações vigentes e órgãos reguladores internacionais.

2 METODOLOGIA

2.1 Instrumento e procedimentos de coleta dos dados

O desenvolvimento teórico deste trabalho foi embasado na busca de informações relevantes em artigos científicos via Portal Capes, disponíveis nas bases de dados de Science Direct, Scielo, entre outros. Além de guias disponibilizados publicamente por sites governamentais como ANVISA, EMA, FDA e OMS.

Uma metodologia de revisão bibliográfica é um processo sistemático de identificação, análise, síntese e interpretação de informações presentes em fontes bibliográficas relevantes para um determinado tema. A revisão bibliográfica é um método de pesquisa que busca reunir, avaliar e sintetizar evidências disponíveis sobre um tópico específico, proporcionando uma visão abrangente do conhecimento existente (UNETTA; GUERRA, 2023).

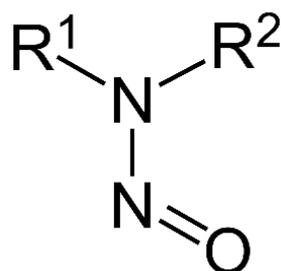
As pesquisas foram realizadas no período de maio a dezembro de 2023, utilizando as palavras-chave no foco da pesquisa: Nitrosaminas, IFA, carcinogênico, mutagênico, produto farmacêutico, legislações, RDC, Impurezas Genotóxicas, European Medicines Agency (EMA), International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Os termos foram pesquisados em língua inglesa e portuguesa.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 N-Nitrosaminas

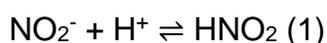
As N-nitrosaminas são impurezas carcinogênicas que apresentam grupo N-nitroso em sua estrutura química.

Figura 4: Estrutura geral de N-nitrosaminas



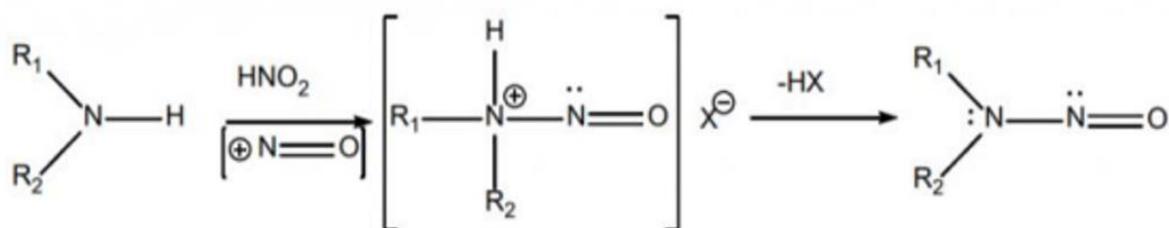
Fonte: ANVISA (2020).

Nas equações químicas a seguir é possível observar um dos possíveis mecanismos *in vivo* para formação de uma nitrosamina. O íon nitroso (NO_2^-) não é agente nitrosante efetivo, sendo necessário meio ácido, formando ácido nitroso, um intermediário (equação 1). Em seguida, o agente nitrosante reage com uma amina, dando origem a uma nitrosamina (equação 2)⁴⁻⁵.



Na Figura 5, podemos observar uma representação de rota para a formação de uma nitrosamina, partindo de uma amina secundária e passando por seu intermediário.

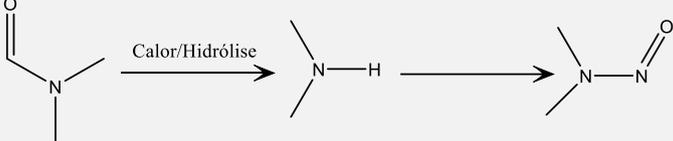
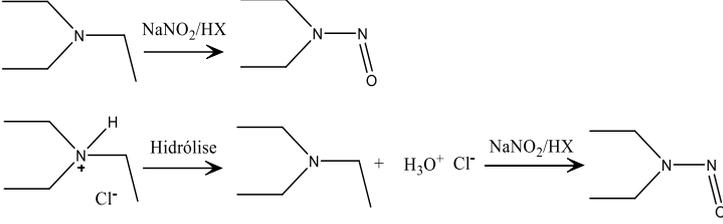
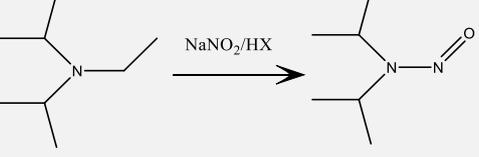
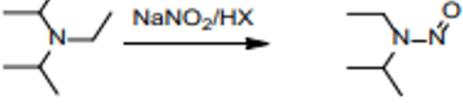
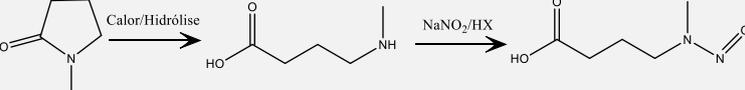
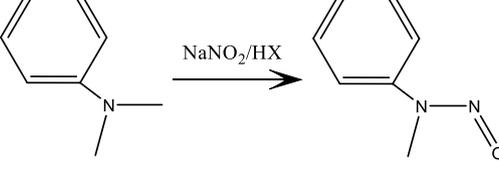
Figura 5: Reação geral da formação de uma N-nitrosamina.

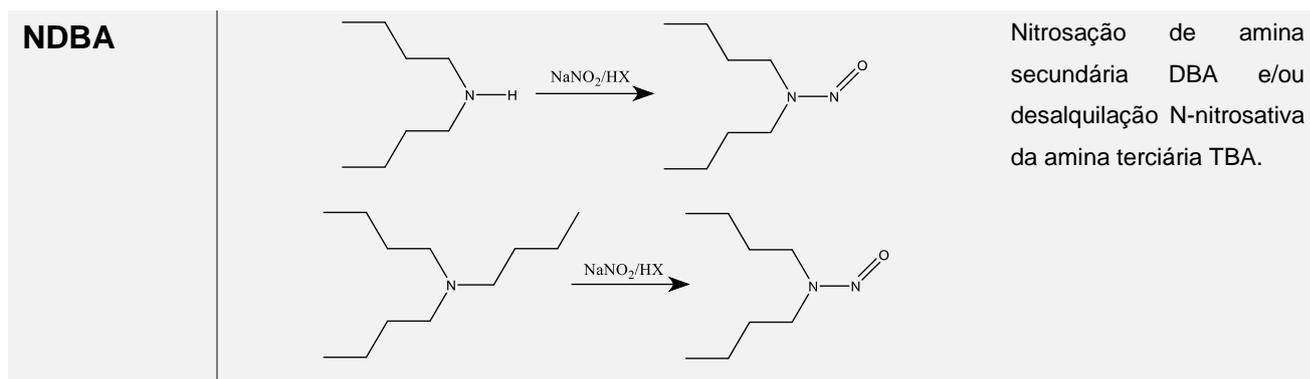


Fonte: Pinto (2021).⁵

As principais nitrosaminas são compostos de baixo peso molecular e podem ser formadas por meio de várias rotas. Por exemplo, a nitrosamina N-Nitrosodietilamina (NDEA) passa por um processo de desalquilação N-nitrosativa da Trietilamina. Outra rota de formação é através da hidrólise do sal de amônio quaternário TEA HCl para gerar a amina terciária Trietanolamina (TEA), seguida por uma desalquilação N-nitrosativa subsequente. O mesmo ocorre com a N-metil-N-nitrosoaminobutirato (NMBA) (EMA, 2023).

Tabela 1: Rotas de formação de N-nitrosaminas e classificação de tipos de reações.

NITROSAMINA	ROTA DE FORMAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO DO TIPO DE REAÇÃO
NDMA	 <p>DMF $\xrightarrow{\text{Calor/Hidrólise}}$ DMA $\xrightarrow{\text{NaNO}_2/\text{HX}}$ NDMA</p>	Degradação hidrolítica e/ou térmica de DMF gerando DMA e subsequente há sua nitrosação.
NDEA	 <p>TEA $\xrightarrow{\text{NaNO}_2/\text{HX}}$ NDEA</p> <p>TEA·HCl $\xrightarrow{\text{Hidrólise}}$ TEA + H₃O⁺ Cl⁻ $\xrightarrow{\text{NaNO}_2/\text{HX}}$ NDEA</p>	Desalquilação N-nitrosativa da trietilamina Hidrólise do sal amônio quaternário TEA HCL para dar origem a amina terciária TEA e subsequentemente ocorre a desalquilação N-nitrosativa.
DIPNA	 <p>DIPEA $\xrightarrow{\text{NaNO}_2/\text{HX}}$ DIPNA</p>	Desalquilação N-nitrosativa da amina terciária DIPEA.
EIPNA	 <p>DIPEA $\xrightarrow{\text{NaNO}_2/\text{HX}}$ EIPNA</p>	Desalquilação N-nitrosativa da amina terciária DIPEA.
NMBA	 <p>NMP $\xrightarrow{\text{Calor/Hidrólise}}$ MBA $\xrightarrow{\text{NaNO}_2/\text{HX}}$ NMBA</p>	Hidrólise e/ou degradação térmica de NMP para gerar a amina secundária MBA e subsequentemente a N-nitrosação.
NMPA	 <p>DMA $\xrightarrow{\text{NaNO}_2/\text{HX}}$ NMPA</p>	Desalquilação N-nitrosativa da amina terciária N,N-DMA.



Fonte: EMA (2023).

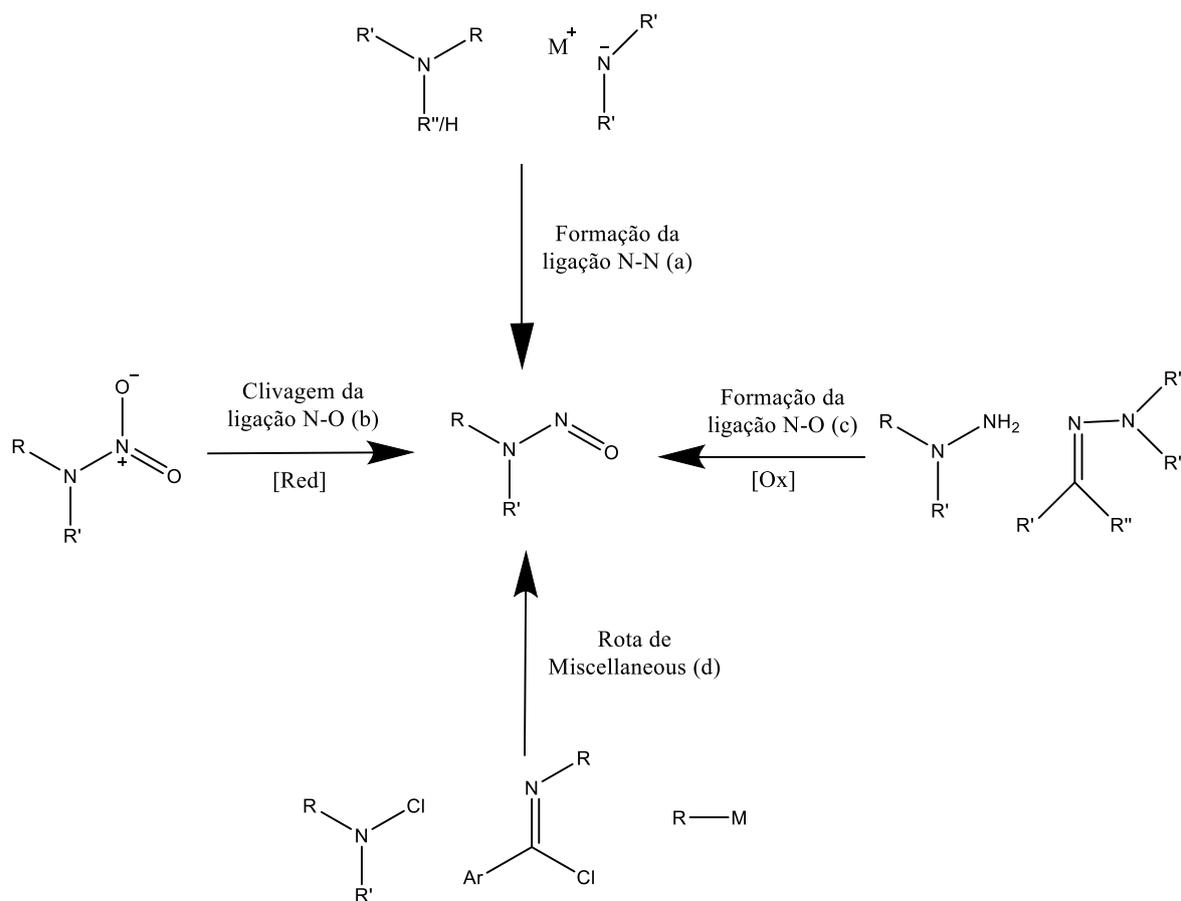
No entanto, à medida que se avançaram os estudos, tornou-se evidente que existem mecanismos adicionais além dos mencionados anteriormente. Este fenômeno transcende os limites dos meios ácidos, revelando-se através de reações de redução, oxidação e outros processos.

Assim, as conclusões iniciais, embora valiosas, fornecem apenas uma visão parcial do cenário, destacando a necessidade de se realizar mais pesquisas e estudos científicos.

3.2 Mecanismos de formação de nitrosaminas

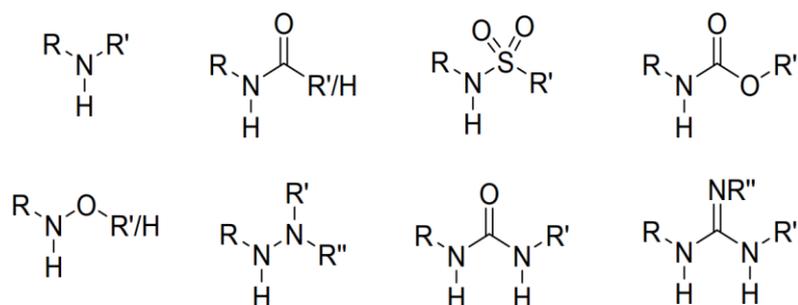
Além do mecanismo presente na Figura 5, é possível que as nitrosaminas sejam formadas a partir de outras rotas e meios reacionais. Alguns trabalhos demonstraram que a interação de uma amina secundária com nitrito ocorreu prontamente em meio alcalino na presença de um composto carbonílico, além da presença de nitrosaminas em tabaco, resultado de nitrosação em meio não ácido¹.

A Figura 6 apresenta uma análise que aborda quatro rotas de síntese distintas para a formação de nitrosaminas, as quais podem ser observadas na Figura 6. Na primeira rota (a), observa-se a formação por meio da ligação N-N, estabelecida entre um agente nitrosante e uma amina. Por sua vez, nas rotas (b) e (c), ambas já possuem dois átomos de nitrogênio na molécula. Na rota (b), a molécula passa por um processo de redução, ocorrendo a clivagem da ligação N-O. Importa ressaltar que esses casos são mais restritos e ocorrem apenas quando há nitroaminas como reagentes. Por fim, na rota (c), ocorre uma reação de oxidação, resultando na incorporação de um átomo de oxigênio à molécula⁸.

Figura 6: Caminhos de formação de compostos N-nitrosos

Fonte: Adaptado de Lopez-Rodrigues *et al.* (2020).⁸

É relevante observar que qualquer substância que contenha o grupo NH tem o potencial de ser suscetível à N-nitrosação eletrofílica. Isso abrange uma ampla gama de compostos, além das aminas, como amidas (ou suas variações heterocíclicas), carbamatos, hidroxilaminas, éteres de hidroxilamina, hidrazinas, hidrazonas, hidrazidas, ureias e guanidinas (Figura 7)⁸.

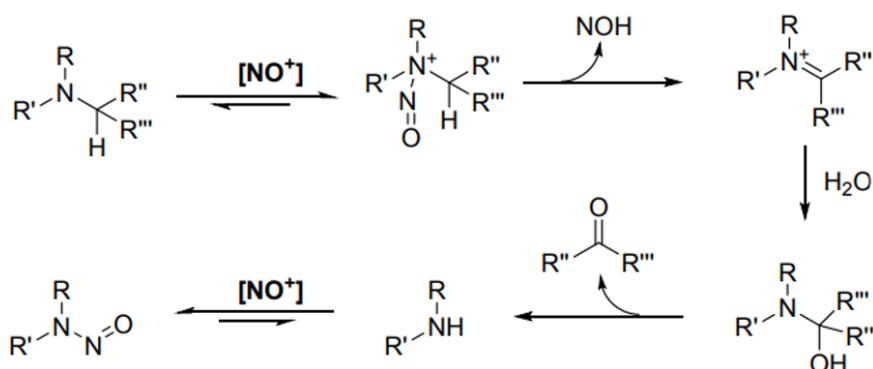
Figura 7: Compostos suscetíveis à N-nitrosação

Fonte: adaptado Lopez-Rodrigues *et al.* (2020).⁸

A primeira substância da Figura 7 é uma amina secundária, sendo que os demais compostos apresentados têm reatividade igual ou inferior a ela por conta do fraco caráter nucleofílico. As hidrazinas ($\text{H}_2\text{N-NH}_2$) e as hidroxilamina ($\text{H}_2\text{N-OH}$) são tão nucleofílicas quanto as aminas. Além disso, foi observado que estruturas aromáticas contendo ligações N-H, como no pirrol, sofrem nitroação⁸.

A formação de nitrosaminas a partir de aminas terciárias é mais difícil de ocorrer pois é necessário que tenha um hidrogênio na posição alfa, que, em meio ácido, passará por um processo de desalquilação.

Figura 8: Mecanismo de desalquilação da amina terciária⁸.



Fonte: Rocío *et al.* (2020).⁸

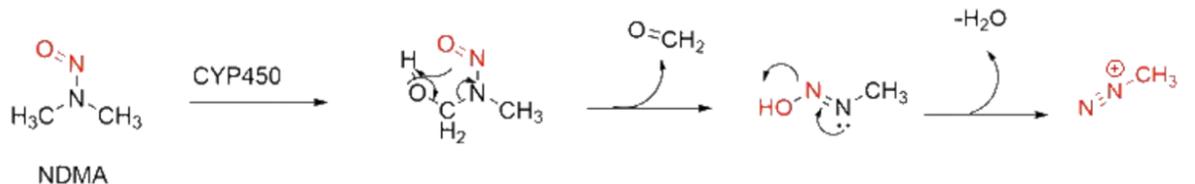
Como representado na Figura 8, a amina terciária reage com o grupo nitroso (NO^+), que em seguida sofre um rearranjo, ocasionando a perda do grupo NOH e levando à formação de um intermediário ímínio, que é hidrolisado, levando a liberação de um grupo carbonila e gerando a amina secundária, que poderá levar a formação de uma nitrosamina dependendo da concentração de agente nitrosante no meio. Por requererem essa etapa extra de desalquilação, as aminas terciárias são significativamente menos reativas que as aminas secundárias⁸.

Compreender os mecanismos de formação de nitrosaminas representa um elemento crucial nesta pesquisa. No entanto, como será apresentado a seguir, o que confere à nitrosamina sua propriedade mutagênica é seu metabolito, e a potência está vinculada aos substituintes associados ao átomo de nitrogênio.

3.3 Toxicologia, classificação e controle de nitrosaminas

No que tange às moléculas de nitrosaminas, é importante ressaltar que elas, por si só, não apresentam propriedades mutagênicas; no entanto, seus metabólitos são mutagênicos. A Figura 9 proporciona uma visualização esclarecedora de um mecanismo de α -hidroxilação enzimática da nitrosodimetilamina (NDMA). Nesse processo, o metabolismo de ativação da nitrosamina é desencadeado pela ação do citocromo P450, resultando na adição de um grupo hidroxila ao carbono em posição alfa em relação ao átomo de nitrogênio na molécula. Em seguida, ocorre um rearranjo molecular que conduz à eliminação de um composto carbonilado, dando origem à espécie hidroxilada. Por fim, ocorre a liberação de uma molécula de água, culminando na formação do agente alquilante conhecido como sal de Diazônio.

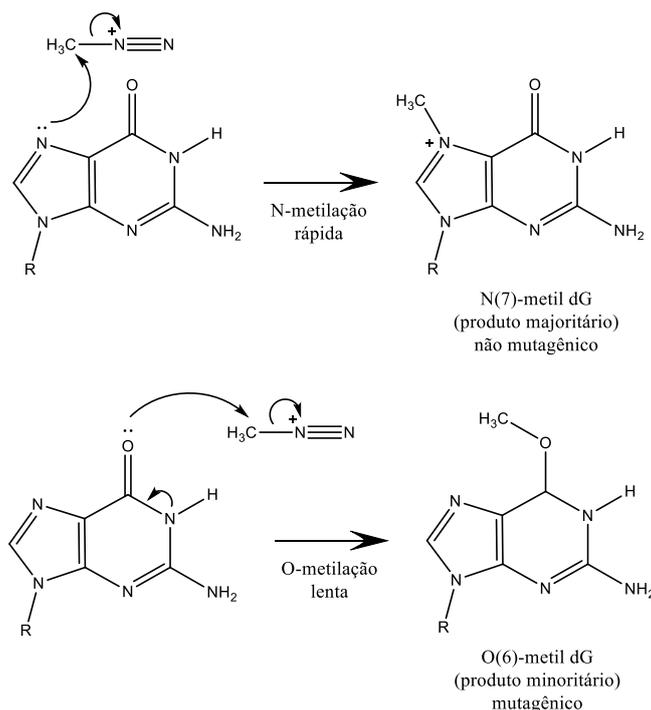
Figura 9: Transformação da nitrosamina NDMA em diazônio por via de α -hidroxilação enzimática



Fonte: Autoria própria (2023).

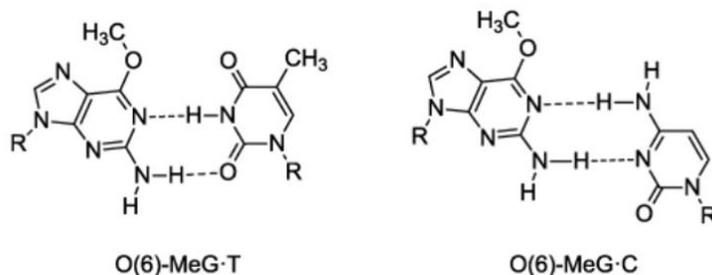
Os íons diazônio desempenham um papel significativo na formação de carbocátions, que são espécies positivamente carregadas e eletrofílicas com a capacidade de se ligarem ao DNA⁹. A localização específica onde o grupo alquil é adicionado pode ter um impacto direto nas pontes de hidrogênio formadas com outras bases nitrogenadas. Isso pode levar a modificações nas ligações de pareamento, resultando em pareamentos incorretos. O acúmulo dessas modificações pode, por sua vez, dar origem a mutações genéticas.

Na Figura 10, é possível visualizar a representação de dois pares de elétrons que têm a capacidade de reagir com o diazônio, formando tanto compostos não mutagênicos quanto compostos mutagênicos.

Figura 10: Ataque de diazônio a base nitrogenada guanina

Fonte: Autoria própria (2023).

A formação do composto O(6)-metilguanina ocorre quando um grupo alquil é adicionado ao oxigênio da posição 6 da guanina. Esse processo impossibilita a formação adequada de pontes de hidrogênio entre o oxigênio da guanina e o hidrogênio da citosina. Além disso, ele induz mutações de transição, resultando na substituição da guanina (G) pela adenina (A). Isso, por sua vez, leva à formação do par de bases O(6)-MeG-T, ao invés do par O(6)-MeG-C, como observado na Figura 11.

Figura 11: Pontes de hidrogênio entre guanina alquilada e timina, e entre guanina alquilada e citosina

Fonte: Autoria própria (2023).

No cenário em que o número de mutações ultrapassa a capacidade de reparo do DNA, surge a preocupação com a possibilidade de desenvolvimento de câncer.

Devido à ausência de agentes alquilantes, é pertinente observar que as aminas primárias não são alvo de preocupação, uma vez que os diazônios que se originam a partir dessas moléculas não demonstram capacidade de reação com as bases nitrogenadas do DNA.

Diante desse conhecimento, torna-se crucial estabelecer um controle efetivo e uma classificação das nitrosaminas que podem ser geradas a partir do IFA. Nesse contexto, é possível recorrer a diretrizes como o ICH M7, que aborda a avaliação e o controle de impurezas mutagênicas. Esse guia classifica as nitrosaminas como um grupo de preocupação, indicando a necessidade de uma avaliação mais rigorosa e restritiva nesse sentido.

A Tabela 2 apresenta as principais nitrosaminas de baixo peso molecular e suas doses diárias máximas.

Tabela 2: Limites de aceitação para nitrosaminas

Nitrosamina (sigla)	Nomenclatura	CAS	Ingestão aceitável (ng/dia)
NDMA	Dimetilnitrosamina	62-75-9	96,0
NDEA	Dietilnitrosamina	55-18-5	26,5
EIPNA	Etilisopropilnitrosamina	16339-04-1	26,5
DIPNA	di-isopropilnitrosamina	601-77-4	26,5
NMBA	Carboxipropilmetilnitrosamina	61445-55-4	96,0
MeNP	Metilnitrosopiperazina	16339-07-04	26,5
NDBA	Dibutilnitrosamina	924-16-3	26,5
NMPA	Fenilmetilnitrosamina	614-00-6	34,3
NMOR	Nitrosomorfolina	59-89-2	127,0
NNV	Nitrosovareniclina	-	37,0
NDPA	Dipropilnitrosamina	621-64-7	26,5

Fonte: Guia sobre o controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos, (2021, p.20).⁹

Os limites de ingestão aceitáveis foram determinados com base nas

orientações do Guia ICH M7 e harmonizada com os limites já aceitos por outras autoridades regulatórias (EMA 2020b, EMA 2022, FDA 2020), resultando nos dados listados na Tabela 1, limites estes encontrados através de estudos de carcinogenicidade em animais ou por similaridade estrutural com compostos já testados⁹.

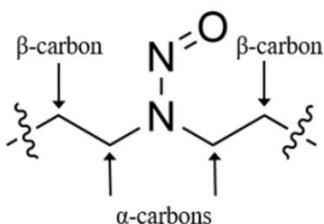
Como mencionado anteriormente, o Apêndice 1 publicado pelo EMA em 2023, fornece uma tabela abrangente que lista diversos compostos, suas fontes de origem, categorias associadas e as ingestões diárias aceitáveis em nanogramas.

Um exemplo é a nitrosamina 1-metil-4-nitrosopiperazina, que pode ser derivada da Rifampicina, um antibiótico bactericida. O limite de ingestão diária aceitável para essa substância é estabelecido em 400ng/dia. Essa avaliação foi conduzida com base na abordagem de relação estrutura-atividade (*structure-activity-relationship* - SAR) / *Read-across* (leitura cruzada), utilizando a TD50 de NPYR como ponto de partida. A nitrosamina 1-metil-4-nitrosopiperazina foi categorizada como pertencente à categoria 3 (EMA,2023).

As categorizações das nitrosaminas são definidas com base em um fluxograma que avalia o potencial carcinogênico dessas substâncias. Elas variam de 1 a 5, onde a categoria 1 engloba as nitrosaminas mais potentes, com um limite de ingestão aceitável mais restrito (18 ng/dia), enquanto a categoria 5 inclui aquelas de menor potencial, com um limite de ingestão aceitável mais elevado (1500 ng/dia) (EMA,2023).

Para determinar a categoria a que uma nitrosamina pertence, são considerados fatores como a quantidade de hidrogênios na posição alfa (Figura 12) da molécula, características desativadoras e características ativadoras, que fornecem um valor específico para calcular a pontuação (EMA, 2023).

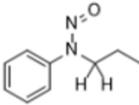
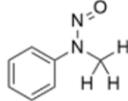
Figura 12: Representação estrutural de carbonos α e β em uma nitrosamina



Fonte: EMA Nitrosamines (2023).

A Tabela 3 ilustra as diferentes definições de α -hidrogênio para a estrutura das N-nitrosaminas, contando o número de átomos de hidrogênio em cada carbono α . No primeiro exemplo, observa-se a ausência de átomos de hidrogênio em um dos radicais na posição α , enquanto o segundo radical apresenta dois átomos de hidrogênio (EMA, 2023), logo a contagem de átomos de hidrogênio ligados a carbonos alfa fica 0,2, ou seja, um carbono com 0 e outro com 2, vindo primeiro o valor menor.

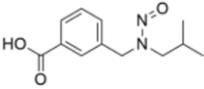
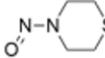
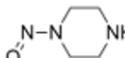
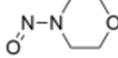
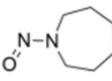
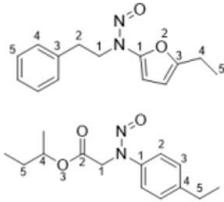
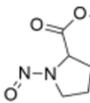
Tabela 3: Contagem de átomos de hidrogênio em cada α -carbono (do menor número primeiro) e a pontuação de α -Hidrogênio correspondente.

Contagem de átomos de hidrogênios em cada carbono- α , menor primeiro	Exemplos	Pontuação de hidrogênios α
0,2		3
0,3		2
1,2		3
1,3		3
2,2		1
2,3		1

Fonte: EMA (2023).

A presença de grupos carboxílicos, nitrosaminas em anel de pirrolidina ou em anel de seis membros com a presença de pelo menos um átomo de enxofre acrescenta mais 3 pontos. Outros grupos e pontuações são observados na Tabela 4.

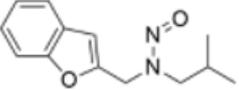
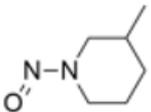
Tabela 4: Lista de características de desativação e pontuações associadas

Aspecto desativador	Exemplos	Pontuação individual do aspecto desativador
Grupo ácido carboxílico em qualquer local na molécula.		+3
Grupo N-nitroso em um anel pirrolidina.		+3
Grupo N-nitroso em um anel de 6-membros contendo pelo menos um átomo de Enxofre.		+3
Grupo N-nitroso em um anel de 5 a 6 membros.		+2
Grupo N-nitroso em um anel Morfolina.		+1
Grupo N-nitroso em um anel de 7 membros.		+1
Cadeias de ≥ 5 átomos consecutivos de não hidrogênios (cíclicos ou acíclicos) em ambos os lados do grupo N-nitroso. Não mais do que 4 átomos podem estar no mesmo anel.		+1
Grupo retirador de elétrons ligado ao carbono- α em apenas um lado do grupo nitroso (cíclicos ou acíclicos).		+1

Fonte: EMA (2023).

Existem também os grupos ativadores, que subtraem pontuações, tornando as nitrosaminas mais potentes, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Lista de características de ativação e pontuações associadas

Aspecto ativador	Exemplos	Pontuação individual do aspecto ativador
Grupo Aril ligado a um carbono- α (isto é, substituinte benzílico ou pseudo benzílico no grupo N-nitroso).		-1
Grupo Metil ligado ao carbono- β (cíclicos ou acíclicos).		-1

Fonte: EMA (2023).

Ao somar as pontuações mencionados anteriormente, se o valor resultante for igual ou superior a quatro, a classificação de potencial será 4. Valores de 3 e 2 correspondem às categorias 3 e 2, respectivamente. Por fim, uma pontuação igual ou menor que 1 indica nitrosaminas de maior potencial cancerígena/mutagênico.

Após compreender os processos de formação das nitrosaminas, a geração de seus metabólitos e os limites de ingestão associados ao potencial mutagênico de cada nitrosamina, torna-se viável realizar uma avaliação de risco nos insumos farmacêuticos ativos, utilizando informações disponíveis no Dossiê de Informações de Fármacos Ativos (DIFA).

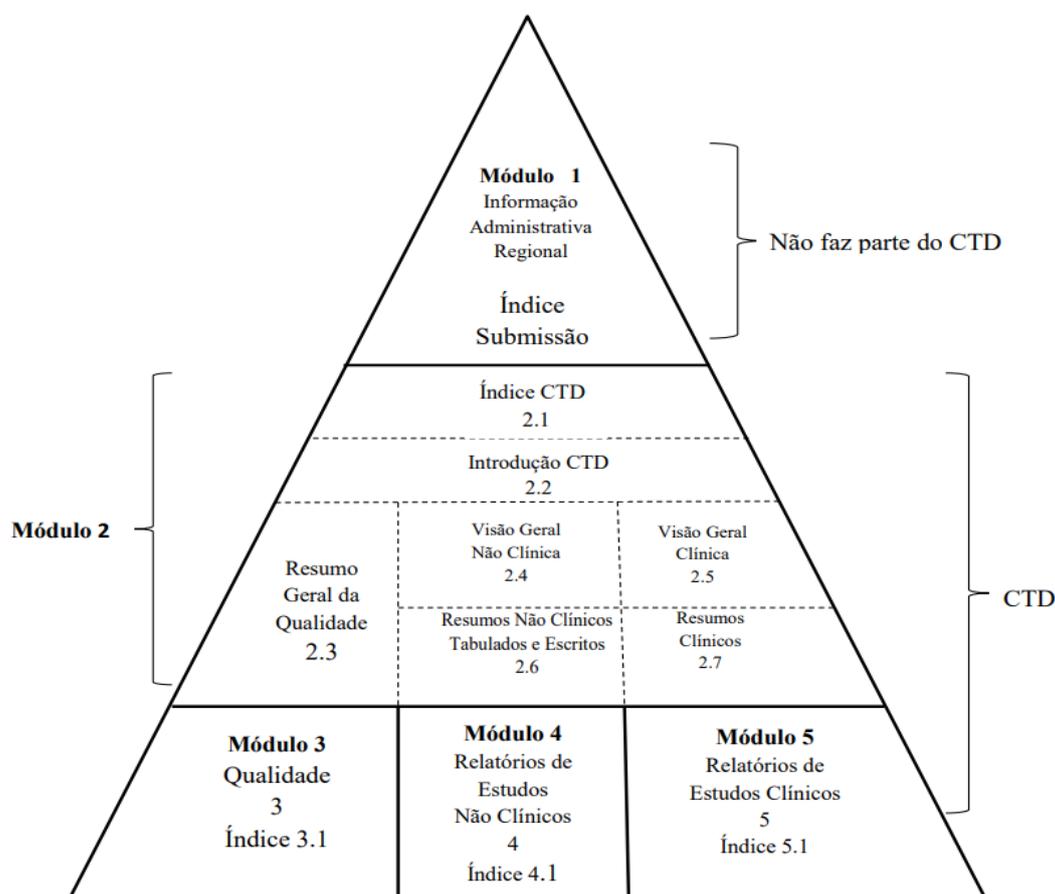
3.4 Importância da análise do DIFA

Medicamentos são compostos do princípio ativo (em alguns casos há mais de um insumo farmacêutico ativo em uma mesma formulação) e de excipientes, e são fabricados em sua maioria pelas indústrias farmacêuticas. Muitas dessas indústrias não produzem seus próprios IFAs e realizam a aquisição através de farmoquímicas, que compilam toda documentação administrativa e de qualidade em um documento chamado DMF (*Drug Master File*), que no Brasil é conhecido como DIFA (Dossiê de Insumo Farmacêutico Ativo), que é instituído pela RDC 359/2020.

Os dossiês submetidos às entidades regulatórias seguem um padrão de harmonização, denominados como Documentos Técnicos Comum (CTD - *Common Technical Document*), cuja estrutura pode ser visualizada na Figura 13. O principal enfoque é no modulo 3, que trata sobre a qualidade. Na substância ativa, os detalhes estão na seção 3.2.S., abrangendo informações gerais da molécula, processo de

fabricação, caracterização, controle, referências, embalagem e estudo de estabilidade (ICH M4Q).

Figura 13: Triângulo CTD.



Fonte: (GUIA Nº 24/2019 – Versão 1).

Na seção 3.2.S.3.2 o fabricante deve trazer informações sobre as impurezas que podem ser formadas durante o processo de fabricação do IFA, trazendo juntamente uma discussão de destino, eliminação, controle e proposta de critérios de aceitação¹¹. Para nitrosaminas, o fabricante deve trazer uma análise de risco, preferencialmente seguindo o Guia ICH Q9 (Quality Risk Management), realização a análise em três etapas: Avaliação de Risco (1), Testes Confirmatórios (2) e Alterações Pós-Registro (3).

Identificar a transferência de substratos entre etapas, o emprego de reagentes com possíveis contaminantes de amins ou agentes nitrosantes, além das condições operacionais, como temperatura e pH, que podem induzir à degradação de reagentes

ou solventes, são exemplos cruciais a serem considerados na avaliação abrangente do processo de obtenção de um insumo farmacêutico ativo (IFA) e na etapa de avaliação de risco ⁹.

Caso seja detectado um risco é necessário entender qual o potencial de carcinogenicidade, e se será possível considerá-la como uma impureza comum e então ser tratada dentro do escopo do ICH Q3A. Por outro lado, caso a nitrosamina seja potencialmente perigosa e/ou esteja num fármaco com alta ingestão diária, é necessário seguir alguns passos para determinar se o risco é mitigável ou se será necessário adotar um controle, passando então para a etapa dos testes confirmatórios.

Dependendo de qual etapa do processo a impureza é formada, os métodos para mitigar o risco são diferentes. Se a impureza é formada no início do processo e o fabricante tem pleno conhecimento de seu processo, é possível fazer um cálculo de fator de purga, que avalia se a impureza estará presente no produto final, levando em consideração fatores como volatilidade da impureza, quantidade de etapas, processos de purificação, entre outros (incluindo reatividade química, solubilidade, volatilidade, ionizabilidade e processos especificamente desenvolvidos para remoção das nitrosaminas em questão).

Se o cálculo do fator de purga indicar a possível presença da nitrosamina no produto acabado ou se esta se formar nas etapas finais, é crucial confirmar e quantificar sua existência por meio de métodos analíticos, com base no limite aceitável, que leva em consideração a ingestão aceitável da impureza multiplicada pelo o fator interligado à duração do tratamento, pela dose máxima diária do medicamento.

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 alternativa seria efetuar a quantificação de nitrosamina em lotes sequenciais. Se o limite detectado for inferior a 30% do limite de ingestão aceitável, o fabricante tem a opção de adotar o método de *skip test*. Neste método, a impureza não é testada em todos os lotes, mas ocasionalmente é verificada.

Além da seção de impurezas é relevante observar se há possível contaminação de nitrosaminas nas seções 3.2.S.6 que trata sobre a embalagem do produto e a seção 3.2.S.7 que trata sobre a estabilidade, podendo trazer informações

sobre produtos de degradação que podem levar a formação de nitrosaminas.

Considerando todas as questões apresentadas, pode afirmar que a formação na área química é importante para entender tais processos e determinar se o fabricante está em conformidade com as diretrizes e legislações, viabilizando a aquisição segura do fármaco pela indústria farmacêutica. Além disso, essa formação ajuda a prevenir a abertura de exigências por irregularidades durante o processo de registro e pós-registro.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As N-nitrosaminas vem sendo estudadas há décadas, mas a partir da descoberta dessas impurezas em medicamentos, em 2018, o número de estudos e investigações tem crescido drasticamente, a fim de obter resultados mais confiáveis e mais praticáveis para as indústrias de medicamentos e farmoquímicas, no que diz respeito à segurança da população.

Mesmo com todo o avanço reportado, ainda restam muitas incertezas em relação a nitrosaminas, sobretudo com relação às mais complexas, suspeitando-se que sejam menos mutagênicas devido a efeitos estéricos, rotas metabólicas diferenciadas, maior peso molecular ou variações em suas propriedades físico-químicas. Para esclarecer essas incertezas, é imprescindível reunir e analisar um amplo conjunto de dados. Portanto, a relevância desse tema reside na busca por compreender a interconexão entre a estrutura molecular e a reatividade, visando estabelecer limites seguros e precisos.

O assunto sobre impurezas com potencial mutagênico e carcinogênico continuará sendo estudado e pesquisado, portanto, muitas mudanças podem ocorrer no âmbito regulatório, demandando uma adaptação constante dos fabricantes de farmoquímicas e medicamentos, buscando sempre oferecer produtos seguros à população.

REFERÊNCIAS

1. LIJINSKY, W. N-Nitroso compounds in the diet. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 443, issues 1–2, p. 129-138, 1999.
2. LIJINSKY, W., CONRAD, E., VAN DE BOGART, R. Carcinogenic Nitrosamines formed by Drug/Nitrite Interactions. **Nature**, v. 239, p. 165–167, 1972.
- 3- BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº.677, de 28 de abril de 2022. Dispõe sobre a avaliação de risco e controle de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em Insumos Farmacêuticos Ativos (IFA) e medicamentos de uso humano. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 abr. 2022.
4. AGLIO, T. C. et al. N-Nitrosaminas em medicamentos: um problema atual, uma realidade antiga. **Química Nova**, v. 45, p. 959-976, 2022.
5. LAPO, Maria Inês Ferreira. **Risk assessment and mitigation of the presence of Nitrosamine impurities in medicines**. 2021. Tese de mestrado (Engenharia Farmacêutica) - Universidade de Lisboa, Lisboa, 2021.
6. BEARD, J. C.; SWAGER, T. M. An organic chemist's guide to N-nitrosamines: their structure, reactivity, and role as contaminants. **The Journal of organic chemistry**, v. 86, n. 3, p. 2037-2057, 2021.
7. Hecht SS. Approaches to Cancer Prevention Based on an Understanding of N-Nitrosamine Carcinogenesis. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 2, p. 181-191, 1997.
- 8- LÓPEZ-RODRÍGUEZ, Rocío et al. Pathways for N-nitroso compound formation: secondary amines and beyond. **Organic Process Research & Development**, v. 24, n. 9, p. 1558-1585, 2020.
- 9- Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos. **Guia nº 50/2021**. Disponível em: <[https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6279847/\(1\)Guia_50_Nitrosaminas_rev_final_para+publica%C3%A7%C3%A3o.pdf/12af2904-e5a7-4774-9528-f4f633cac2bf](https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6279847/(1)Guia_50_Nitrosaminas_rev_final_para+publica%C3%A7%C3%A3o.pdf/12af2904-e5a7-4774-9528-f4f633cac2bf)>. Acesso em: 11 nov. 2023.
- 10-EMA. **Nitrosamine impurities**. 2023 Disponível em: <<https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/post-authorisation/referral-procedures/nitrosamine-impurities>>. Acesso em: 11 nov. 2023.
- 11- Coordenação de Registro de Insumos Farmacêuticos Ativos. **Manual técnico**. Disponível em: <<https://coifa.anvisa.gov.br/guia.html>>. Acesso em: 11 nov. 2023.
- 12- BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº.359, de 27 de março de 2020. Institui o dossiê de Insumo Farmacêutico Ativo (DIFA) e a Carta de Adequação de dossiê de Insumo Farmacêutico Ativo (CADIFA). Diário Oficial da União, Brasília, DF, 27 mar. 2020.