

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

**NITROSAMINAS EM MEDICAMENTOS: PASSADO, PRESENTE E FUTURO –
UM OLHAR REGULATÓRIO**

Mariana Camata Krabbe

Trabalho de Conclusão do Curso de
Farmácia-Bioquímica da Faculdade de
Ciências Farmacêuticas da Universidade
de São Paulo.

Orientador(a):
Dr.a Roberta Lopes Drekenner

São Paulo
2023

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVO.....	9
3. METODOLOGIA.....	9
4. DISCUSSÃO.....	10
4.1. Análise de risco.....	10
4.2. Principais desafios.....	16
4.3. Perspectivas sobre o tema.....	20
5. CONCLUSÃO.....	24
6. REFERÊNCIAS.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DOE: *Design of Experiments*

DOU: Diário Oficial da União

EDQM: *European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare*

EMA: *European Medicines Agency*

FDA: *Food and Drug Administration*

IARC: *International Agency for Research on Cancer*

ICH: *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*

IFA: Insumo Farmacêutico Ativo

GC-MS: *Gas Chromatography/Mass Spectrometry*

GSRS: *Global Substance Registration System*

HS-GS/MS: *Headspace-gas Chromatography/Mass Spectrometry*

LC-MS: *Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*

INCQS: Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

NDMA: N-nitrosodimetilamina

NDSRI: *Nitrosamine Drug Substance Related Impurities*

PPB: *Parts Per Billion*

PPM: *Parts Per Million*

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

SAR: *Structure-Activity Relationship*

TTC: *Threshold of Toxicological Concern*

RESUMO

KRABBE, M. C. **Nitrosaminas em medicamentos: passado, presente e futuro – um olhar regulatório.** 2022 nº 1323-22. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Palavras-chave: nitrosaminas, ANVISA, regulamentação, impurezas, ICH M7

As nitrosaminas são um grupo de compostos potencialmente carcinogênicos presentes como impurezas em fármacos. Discussões sobre nitrosaminas em medicamentos têm ganhado destaque no cenário mundial desde 2018, quando a agência reguladora americana FDA determinou o recolhimento de lotes do medicamento valsartana devido à presença de um tipo de nitrosamina. Desde então, embasados em conhecimentos constantemente atualizados acerca do tema, esforços regulatórios têm movimentado o setor farmacêutico em prol do estabelecimento de melhor controle dessas impurezas.

O presente trabalho tem como objetivo reunir os aspectos históricos relacionados ao assunto, estabelecer o status regulatório atual e, então, analisar o cenário para identificação de desafios e possíveis tendências futuras sobre o controle de nitrosaminas em medicamentos. Como base para busca e análise, foram utilizados guias regulatórios das agências ANVISA, EMA e FDA, além de bibliografia relacionada às principais observações e descobertas do setor regulado e a ações relevantes de agências reguladoras.

Desde o primeiro recolhimento de lotes contaminados em 2018, mudanças no cenário regulatório têm acontecido acompanhando as novas descobertas. Frente à complexidade do tema, derivada principalmente das diversas possíveis fontes de contaminação por nitrosaminas, o setor regulado precisa superar diversos desafios não apenas na análise de risco teórica, mas também durante a realização de testes confirmatórios. Nesse contexto, se faz importante a atuação conjunta das agências reguladoras a fim de que as diretrizes sejam constantemente atualizadas, e através desses esforços, haja continuidade na promoção de saúde e segurança à população.

ABSTRACT

Nitrosamines are a group of potentially carcinogenic compounds present as impurities in drugs. Discussions about nitrosamines in medicines have gained prominence on the world stage since 2018, when the American regulatory agency FDA determined the recall of batches of the drug valsartan due to the presence of a type of nitrosamine. Since then, based on constantly updated knowledge on the subject, regulatory efforts have moved the pharmaceutical sector in favor of establishing better control of these impurities.

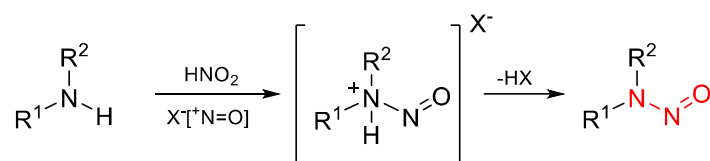
The present work aims to bring together the historical aspects related to the subject, establish the current regulatory status and then, analyze the scenario to identify challenges and possible future trends on the control of nitrosamines in medicines. As a basis for the search and analysis, regulatory guidelines from ANVISA, EMA and FDA were used, as well as bibliography related to the main observations and findings of the regulated sector and relevant actions by regulatory agencies.

Since the first recall of contaminated batches in 2018, changes in the regulatory scenario have taken place in line with new discoveries. Faced with the complexity of the subject, mainly derived from the various possible sources of contamination by nitrosamines, the regulated sector needs to overcome several challenges, not only in the theoretical risk analysis, but also during the performance of confirmatory tests. In this context, it is important for the regulatory agencies to work together so that the guidelines are constantly updated, and through these efforts, there is continuity in the promotion of health and safety to the population.

1. INTRODUÇÃO

Na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 53 de 2015, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define impureza como “qualquer componente presente no insumo farmacêutico ou no produto terminado que não seja o insumo farmacêutico ativo nem o(s) excipiente(s)”. As nitrosaminas (ou N-nitrosaminas) são impurezas não restritas apenas a medicamentos e insumos farmacêuticos, mas que também podem ser encontradas em alimentos e até mesmo na água; além disso, estão presentes na fumaça provinda da queima do tabaco (BARTSCH & MONTESANO, 1984). Estes compostos são moléculas de esqueleto $R_2N-N=O$ e podem ser obtidos por uma série de reações químicas (PATAI, 1982), sendo mais comum sua obtenção a partir de aminas na presença de um agente nitrosante – por exemplo, nitrito de sódio em meio ácido (Esquema 1):

Esquema 1 – Formação de uma impureza nitrosamina.



Fonte: Adaptado de FDA, 2021.

Impurezas dessa classe podem apresentar elevadas mutagenicidade e carcinogenicidade e, nessa condição, estariam diretamente relacionadas ao aumento no risco de desenvolvimento de câncer na população (FDA, 2020). O guia M7(R2) do ICH (do inglês *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*) define diretrizes para avaliação de impurezas DNA-reativas (mutagênicas) em produtos farmacêuticos, e determina que compostos com o grupamento químico N-nitroso fazem parte da chamada “coorte de preocupação” por terem potencial altamente mutagênico (TEASDALE *et al.*, 2022). Isso implica que, para nitrosaminas cujos dados de carcinogenicidade não são conhecidos, o valor padrão de 1,5 µg/dia para o TTC (*threshold of toxicological concern*, que corresponde ao nível de exposição humana a determinada substância que é considerado de risco toxicológico insignificante) não é aplicável. Isso ocorre porque a potência mutagênica

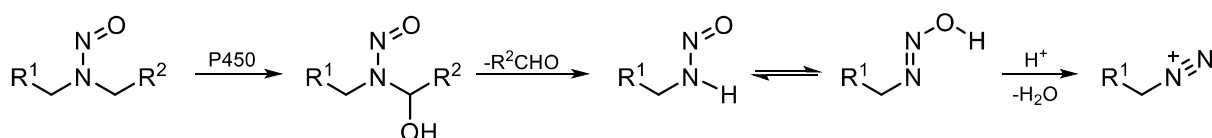
de nitrosaminas pode superar a dos demais compostos mutagênicos (EFSA & WHO, 2016).

Embora a toxicidade de nitrosaminas seja conhecida há décadas (MAGEE & BARNES, 1956), a descoberta dessas impurezas em medicamentos tem causado grande preocupação por representar risco significativo para a saúde pública, uma vez que podem estar presentes em medicamentos de uso crônico e/ou em altas quantidades. Por essa razão, a detecção e prevenção de nitrosaminas em medicamentos é uma questão crítica para a segurança dos pacientes e para a saúde pública em geral.

Apesar de os níveis de nitrosaminas em medicamentos, quando presentes, serem comparáveis ou até inferiores aos presentes em alimentos (SONG & HU, 1988), é importante ressaltar o caráter de uso dos primeiros. Medicamentos são utilizados para tratamento de doenças e, portanto, seu uso não é opcional para aqueles que o fazem. Alimentos em seus diversos tipos, no entanto, são consumidos conforme escolha pessoal. Dessa forma, se faz necessário que agências reguladoras garantam aos usuários de medicamentos o máximo nível de segurança. Sendo possível estabelecer um controle adequado para as impurezas nitrosaminas, é papel ativo dessas agências que haja superação do benefício sobre o risco (ICH E6(R2), 2016), garantindo mitigação de riscos evitáveis.

Alguns mecanismos de ação foram propostos para explicar o elevado potencial carcinogênico desses compostos (AGLIO *et al.*, 2022). Uma das principais vias de mutagenicidade é a de oxidação *in vivo* de nitrosaminas pelas enzimas do citocromo P450, que gera agentes alquilantes de alta reatividade e afinidade pelo DNA levando a danos genéticos e mutações possivelmente causadoras de tumores (OMS, 2010). Para essa via, um possível agente alquilante obtido é o íon diazônio (BEARD & SWAGER, 2021), cujo mecanismo de formação a partir de uma nitrosamina está ilustrado no Esquema 2. Estudos descritos pela IARC (*International Agency for Research on Cancer*) sugerem que o tipo de câncer, bem como o local no qual a doença pode se desenvolver, dependem da ativação diferenciada desses compostos no fígado e da própria estrutura da nitrosamina em si (OMS, 2010). Outros estudos demonstraram haver relação entre ingestão de alimentos conhecidos pela presença dessas impurezas – como carnes curadas, bacon, e cervejas – e o aumento de risco de desenvolvimento de câncer e outras doenças graves, como Alzheimer (LI & HECHT, 2022; MONTE, 2009).

Esquema 2 – Formação do íon diazônio a partir de uma nitrosamina.



Fonte: Adaptado de BEARD & SWAGER, 2021.

Em 2018, o assunto “nitrosaminas em medicamentos” ganhou destaque a partir do recolhimento de lotes de medicamentos com o princípio ativo valsartana pela agência de saúde americana FDA (*Food and Drug Administration*) devido à identificação de contaminação pela impureza *N-nitroso-dimethylamine* (NDMA) pelo fabricante do IFA (insumo farmacêutico ativo), Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co. Ltd. A partir de então, outros fármacos não pertencentes à classe das “sartanas” também passaram a ser investigados, como a ranitidina e a metformina, e os principais fatores de risco para formação de nitrosaminas começaram a ser identificados.

No Brasil, apenas em 2019, foram inspecionados 111 produtos de 30 indústrias farmacêuticas diferentes. A partir disso, 31 ações sanitárias foram realizadas; entre elas, suspensões, interdições e recolhimentos de medicamentos (ANVISA, 2022). Ainda em 2019, a ANVISA publicou no DOU (Diário Oficial da União) a RDC nº 283/2019, que dispõe sobre investigação, controle e eliminação de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em antagonistas de receptor de angiotensina II (ANVISA, 2019).

Em agosto de 2020, a agência europeia EMA (*European Medicines Agency*) publicou o guia nº EMA/409815/2020 com uma abordagem estilo “Perguntas e Respostas” contendo orientações para o setor regulado relacionadas ao tema de nitrosaminas em medicamentos. Este guia é constantemente atualizado e, até a data de finalização desta monografia, encontra-se em seu 15º versionamento.

No mesmo ano, a ANVISA lançou o “Programa Especial de Monitoramento de Nitrosaminas em Medicamentos”, com o objetivo de aprofundamento das investigações relacionadas à presença de nitrosaminas em IFAs. Em linha com os conhecimentos da época, amostras de medicamentos e dos próprios insumos isolados losartana e valsartana foram analisados pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS). As observações foram publicadas em painel interativo pela agência. No ano seguinte, a ANVISA publicou a primeira versão do guia

nº 50/2021, o qual orienta sobre o controle de nitrosaminas em IFAs e medicamentos e atualmente encontra-se em sua segunda versão.

Após extensos estudos, investigações, e contribuições do setor regulado, da academia e de outras agências reguladoras, em abril de 2022 a ANVISA publicou a RDC nº 677/2022, a qual dispõe sobre análise de risco e controle de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em IFAs e medicamentos de uso humano, vigente a partir de junho do mesmo ano. Assim, de forma mais abrangente que a RDC anterior e em convergência com os conhecimentos atuais sobre causas raiz da contaminação de medicamentos por nitrosaminas, passou a ser preconizada avaliação de risco individual quanto à presença dessas impurezas em cada medicamento.

Nesse tipo de análise, deve ocorrer investigação teórica e tomada de decisão, se aplicável, considerando aspectos essenciais dos 3 principais componentes do produto acabado: o IFA, os excipientes e o material de embalagem (ANVISA, 2022).

2. OBJETIVO

Acerca do assunto “nitrosaminas em medicamentos”, essa monografia propõe como objetivos: (i) evidenciar os aspectos históricos e regulatórios já conhecidos sobre o tema, (ii) estabelecer o cenário atual, e (iii) prospectar possíveis tendências regulatórias a partir da observação da conduta técnica adotada por agências sanitárias, bem como através da identificação de eventuais dificuldades no esquema atual de controle dessas substâncias.

3. METODOLOGIA

A presente monografia consiste em uma pesquisa bibliográfica acerca do tema “nitrosaminas em medicamentos”. Foram considerados como fonte para averiguação: artigos científicos, normas sanitárias (RDCs e ofícios), guias regulatórios e notícias que tratam de aspectos históricos, atuais ou acerca de perspectivas sobre o objeto deste trabalho.

Assim, realizou-se um levantamento de fatos relacionados ao tema e estabeleceu-se através da observação de ações de agências sanitárias – principalmente FDA, EMA e ANVISA – o status regulatório atual acerca do controle de nitrosaminas em medicamentos.

Pretendeu-se, também, tecer uma análise da situação atual e da perspectiva futura do assunto, levando em consideração quais são os principais desafios encontrados – tanto pelo setor regulado como pelo órgão regulador – frente à regulamentação vigente sobre o tema.

4. DISCUSSÃO

4.1 Análise de risco

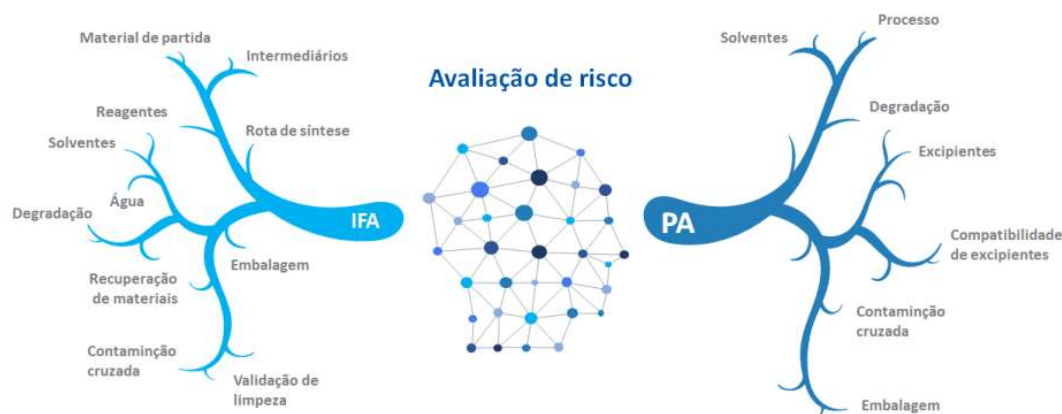
Conforme já apresentado, em 2022 a ANVISA publicou a RDC 677/2022, a qual dispõe sobre análise de risco e controle de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em IFAs e medicamentos de uso humano. A norma se aplica a medicamentos e IFAs regularizados – ou seja, produtos do portfólio de indústrias farmacêuticas sem escopo de regularização – e a novas petições de registro e pós-registro de medicamentos e IFAs.

De forma prática, é possível estabelecer três etapas durante a análise de risco quanto à presença de nitrosaminas em medicamentos. Na primeira etapa deve ocorrer a avaliação de risco teórica, sendo seu resultado essencial para definição se será necessário também seguir pelas próximas duas etapas. Para a etapa 2, devem ser realizados testes confirmatórios. Finalmente, após os resultados obtidos da etapa 2, verifica-se a aplicabilidade de implementação de alterações pós-registro e/ou controles adequados, o que corresponde à etapa 3.

Na etapa 1, alguns fatores centrais devem ser considerados: a rota de síntese do IFA e seu processo produtivo, o processo produtivo do medicamento, além das condições de armazenamento adotadas para ambos (embalagem e acondicionamento). Além disso, é importante mencionar aspectos relacionados à contaminação cruzada entre processos, tanto durante a síntese do IFA como na formulação do produto acabado. Assim, através da integração entre informações do IFA, excipientes, processo de fabricação e embalagem (Figura 1), estabelece-se o

real cenário quanto à possibilidade de nitrosaminas serem formadas e identificadas (ANVISA, 2022).

Figura 1 – Aspectos importantes a serem considerados na avaliação de risco.



Fonte: ANVISA, 2022.

O guia nº EMA/409815/2020 descreve os principais fatores de risco já identificados para formação de nitrosaminas, sendo esse constantemente atualizado. Esses fatores de risco são relacionados ao processo produtivo do IFA, ao produto acabado e a aspectos de boas práticas de fabricação:

- Uso de sais e ésteres de nitrito ou outros agentes nitrosantes na presença de aminas secundárias ou terciárias na mesma ou em diferentes etapas do processo;
- Formação de nitrito por oxidação de hidroxilamina ou liberação de nitrito de precursores nitro-aromáticos na presença de aminas secundárias ou terciárias na mesma ou em diferentes etapas do processo;
- Uso de água desinfetada (cloração, cloraminação, ozonização) na presença de aminas secundárias ou terciárias na mesma ou em diferentes etapas do processo;
- Oxidação de hidrazinas, hidrazidas e hidrazonas por hipoclorito, ar, oxigênio, ozônio e peróxidos durante o processo produtivo ou armazenamento; uso de matérias-primas contaminadas no processo produtivo do IFA;
- Uso de materiais reciclados ou recuperados contaminados;

- Uso de materiais de partidas e intermediários contaminados fornecidos por empresas que usam processos ou matérias-primas que podem conter nitrosaminas ou agentes nitrosantes residuais;
- Carreamento de nitrosaminas geradas deliberadamente durante o processo produtivo;
- Reação de nitrogênio funcionalmente nitrosável em IFAs ou suas impurezas/degradantes com agentes nitrosantes presentes em componentes do produto acabado durante formulação ou armazenamento;
- Processos de degradação de IFAs, incluindo aqueles induzidos pela própria reatividade inerente ou pela presença de agentes nitrosantes exógenos;
- Oxidação de hidrazina ou outros grupos funcionais contendo amina presentes em IFAs ou suas impurezas/degradantes durante processo produtivo/formulação ou armazenamento;
- Uso de certos materiais de embalagem (ex.: componentes com nitrocelulose);
- Reação de lixiviação de aminas de resinas de troca aniônica de amônio quaternário com agentes nitrosantes presentes na fase líquida;
- Contaminação cruzada devido a diferentes processos ocorrerem sucessivamente em uma mesma linha produtiva;
- Carreamento de impurezas entre processos devido a erros relacionados ao operador ou ausência de instruções do processo produtivo;
- Uso de materiais recuperados ou reciclados contaminados para os quais a recuperação é terceirizada por empresas sem conhecimento acerca do material processado; processos de recuperação carreados em equipamentos não dedicados para isto.

Devido aos fatores de risco serem diversos e oriundos de múltiplas fontes, é plausível que em determinados casos não seja possível mitigar o risco de formação de nitrosaminas apenas durante avaliação teórica dos aspectos expostos. É importante mencionar que, caso identificado risco, este deve ser notificado imediatamente à ANVISA. Assim, inicia-se a etapa 2, na qual testes confirmatórios são conduzidos com o objetivo de mitigar o risco apontado em avaliação teórica ou verificar se esse de fato é real e possível.

Para a realização da etapa 2, as principais técnicas analíticas recomendadas para análise de nitrosaminas são as cromatografias líquida e gasosa, ambas acopladas à espectrometria de massas (abreviadas como LC-MS e GC-MS, respectivamente). Atualmente, as agências EMA, FDA e *Health Canada* dispõem de métodos analíticos já desenvolvidos, validados e publicados, os quais são aplicáveis para condução dos testes comprobatórios para algumas nitrosaminas em determinadas matrizes. Apesar de a ANVISA dispor de diretrizes gerais sobre métodos analíticos publicadas no guia nº 50/2021, a Farmacopeia Brasileira ainda não descreve qualquer método analítico específico até a data da finalização desta monografia.

Nesse cenário, é importante ressaltar que embora os métodos descritos sejam identificativos, deve-se considerar que nitrosaminas possuem uma gama de estruturas variadas. Como exemplo, parte delas pode ser derivada da própria estrutura do IFA, sendo essas chamadas de “API-like” ou NDSRIs (*Nitrosamine drug substance-related impurities*). Dessa forma, o desenvolvimento de método deve ser adequado para cada matriz, assim como para cada princípio ativo. Além disso, é necessário que a metodologia seja validada conforme as diretrizes da RDC 166/2017.

Os guias nº EMA/409815/2020 e nº 50/2021 listam os limites seguros e permitidos para N-nitrosaminas específicas já conhecidas (quando presentes de forma isolada) com base em dados toxicológicos (Tabela 1). Com relação ao guia da EMA, é importante mencionar que a relação das impurezas e seus limites fazem parte de suas atualizações.

Tabela 1 – Limites diários para N-nitrosaminas isoladas conhecidas.

N-nitrosamina	TTC (ng/dia)	Fonte
N-Nitrosodimethylamine	96,0	—
N-Nitrosodiethylamine	26,5	—
N-Nitrosoethylisopropylamine	26,5	—
N-Nitrosodiisopropylamine	26,5	—
N-Nitroso-N-methyl-4-aminobutyric acid	96,0	—
1-Methyl-4-nitrosopiperazine	26,5	Rifampicina
N-Nitroso-di-n-butylamine	26,5	—
N-Nitroso-N-methylaniline	34,3	—

N-Nitrosomorpholine	127	–
N-Nitrosovarenicline	37,0	Vareniclina
N-Nitrosodipropylamine	26,5	–
N-Nitrosomethylphenidate	1300	Metilfenidato
N-Nitrosopiperidine	1300	–
N-Nitrosorasagiline	18	Rasagilina
7-Nitroso-3-(trifluoromethyl)-5,6,7,8-tetrahydro[1,2,4]triazolo- [4,3- a]pyrazine	37	Sitagliptina
N-Nitroso-1,2,3,6-tetrahydropyridine	37	–
N-Nitrosonortriptyline	8	Amitriptilina, nortriptilina
N-Methyl-N-nitrosophenethylamine	8	–
N-Nitrosodabigatran	18	Dabigatrana
4-(Methylnitrosoamino)-1-(3-pyridinyl)-1-butanone	100	–
N-nitrosoduloxetine	100	Duloxetina
N-nitroso-fluoxetine	100	Fluoxetina
N-nitrosoparoxetine	1300	Paroxetina
N-nitroso-diphenylamine	78000	–
N-nitroso-mefenamic acid	78000	Ácido mefenâmico
N-nitroso-pyrrolidine	1700	–
N-nitroso-diethanolamine	1900	–

Fonte: Adaptado de EMA, 2023 e ANVISA, 2022.

A partir desses dados, é possível calcular o limite máximo para cada nitrosamina quando sua formação for possivelmente identificada em determinado produto acabado, considerando a dose diária do fármaco (Equação 1):

Equação 1 – Cálculo de limite máximo para uma impureza nitrosamina.

$$\text{Limite máximo (ppm)} = \frac{TTC \left(\frac{ng}{dia} \right)}{\text{Dose máxima diária do fármaco} \left(\frac{mg}{dia} \right)}$$

De forma geral, para impurezas nitrosaminas até então “desconhecidas”, ou seja, ainda não listadas no guia anteriormente referido, é utilizado o TTC de 18 ng/dia. Este valor é derivado de uma base de dados sobre potência carcinogênica de 45

nitrosaminas da empresa de toxicologia Lhasa Limited (Lhasa Limited, 2020). No guia nº EMA/409815/2020 consta ainda um limite temporário de ingestão diária aceitável de 178 ng/dia (nitrosaminas totais) que pode vir a ser aceito em casos em que haja quantidades conhecidas de amina e agente nitrosante disponíveis.

Nos casos em que mais de uma impureza nitrosamina é identificada, é possível utilizar duas possíveis abordagens para definição dos limites, conforme descrito no guia nº 50/2021 (ANVISA, 2022):

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

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

Sendo confirmada a presença de impurezas nitrosaminas no IFA ou no medicamento durante a condução dos testes confirmatórios, uma estratégia de controle adequada para estes compostos deve ser implementada, o que corresponde à etapa 3. Caso os resultados observados estejam dentro dos limites propostos, cabe ao fabricante de IFA e/ou ao fabricante do medicamento seguir(em) conforme orientado pela ANVISA:

*“I - inclusão do teste crítico de controle de nitrosaminas no medicamento;
II - inclusão do teste de controle de nitrosaminas no IFA com CADIFA;
ou
III - inclusão do teste de controle de nitrosaminas no IFA sem CADIFA.”*

Entretanto, caso impurezas nitrosaminas sejam identificadas acima dos limites estabelecidos, é necessário que a empresa suspenda imediatamente a distribuição e comercialização dos medicamentos ou IFAs envolvidos e apresente as informações relevantes à ANVISA por meio de peticionamento em acordo com o artigo 12 da RDC 677/2022 (ANVISA, 2022).

Em relação aos produtos de portfólio sem escopo de regularização previsto (pós-registro), a ANVISA estabeleceu que é necessário o desenvolvimento de uma

matriz de risco relacionada à presença de nitrosaminas nos medicamentos com registro concedido a cada empresa, classificando-os entre os níveis de risco “muito alto”, “alto”, “médio”, “baixo” e “muito baixo”. Sugere-se categorização a partir do modelo abaixo (Tabela 2):

Tabela 2 – Sugestão de matriz para categorização de risco.

Dose máxima diária	Duração do tratamento		
	> 1 ano	1 a 12 meses	≤ 1 mês
> 1000 mg	Muito alto	Alto	Médio
100 a 1000 mg	Alto	Médio	Baixo
< 100 mg	Médio	Baixo	Muito baixo

Fonte: Adaptado de ANVISA, 2022.

Em acordo com a RDC 677/2022, para os produtos classificados sob risco “muito alto”, o prazo de transitoriedade para condução da etapa 1 encerrou-se em 01/03/2023. Para os produtos classificados como risco “alto”, o prazo vale até 01/06/2023, enquanto para os demais produtos a adequação é necessária até 02/06/2025. Entretanto, também foi estabelecido que a ANVISA pode solicitar avaliação de risco em momento anterior ao previsto, a depender do tipo da nitrosamina e de critérios internos da agência. Os prazos relacionados às etapas 2 e 3 iniciam-se imediatamente após a identificação do risco, e contam com 36 meses adicionais para aderência às diretrizes da norma e adequação.

A partir dos parágrafos anteriores, é possível observar a complexidade das etapas de identificação, confirmação e gerenciamento do risco relacionado à presença de nitrosaminas em medicamentos. Neste cenário, diversos desafios têm sido evidenciados por profissionais, empresas e órgãos reguladores diretamente envolvidos nesse processo.

4.2 Principais desafios

A descoberta inicial de contaminação de valsartana pela nitrosamina NDMA em 2018 é um bom exemplo de um dos principais desafios relacionados ao tema nitrosaminas em medicamentos. A própria natureza do trabalho investigativo, a partir do qual não se sabe quais são os possíveis riscos a serem identificados ao longo do

processo, acarreta à avaliação uma complexidade superior às dos demais tipos de avaliações previstas na rotina de uma indústria farmacêutica (como por exemplo avaliação de solventes residuais).

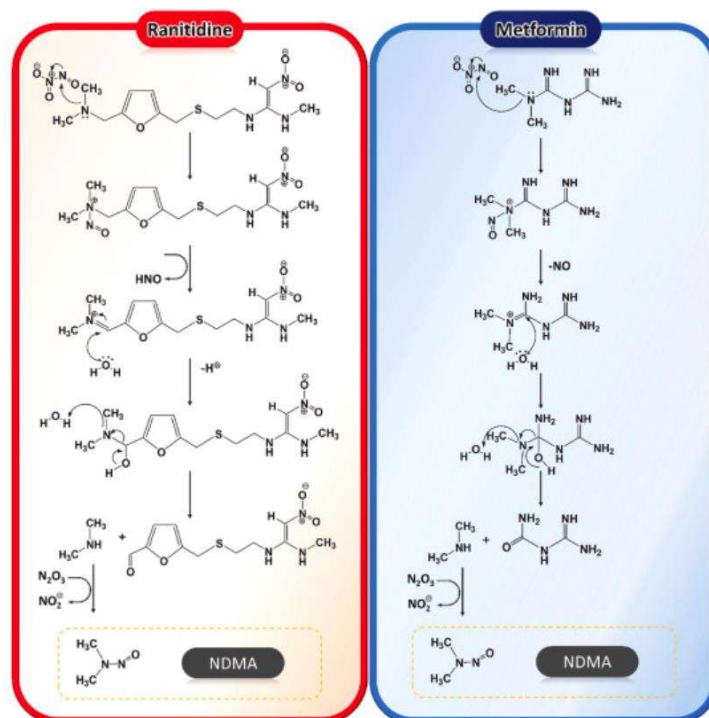
Paralelamente, os níveis encontrados para nitrosaminas em IFAs e medicamentos são esperadamente baixos em relação a impurezas orgânicas ordinárias. Desse modo, a complexidade de identificação e qualificação dessas impurezas – com níveis que podem chegar a ppb (*parts per billion*) – em termos analíticos é bastante dificultosa, se fazendo necessários métodos ultrasensíveis (MOSER *et al.*, 2023).

Com o aumento expressivo na necessidade de realização desses testes a partir das diretrizes da RDC 677/2022, surge também o desafio de aquisição de equipamentos e investimento em tecnologia na mesma velocidade. De forma similar, a partir do estabelecimento dos prazos já abordados anteriormente, urge a necessidade de que os testes sejam conduzidos a tempo.

Outro aspecto relevante com relação às dificuldades analíticas encontradas durante a etapa 2 é que os compêndios oficiais como o EDQM (*European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare*) só dispõem de alguns padrões de referência para nitrosaminas, como *N-nitroso-dibutylamine*, *N-nitrosodiethylamine*, *N-nitroso-diisopropylamine* e *N-nitroso-dimethylamine*. Enquanto isso, padrões de referências para novas impurezas nitrosaminas, como as NDSRIs, não estão disponíveis no mercado, dificultando assim não apenas o processo de desenvolvimento de métodos analíticos, mas a sua validação (ROSE, 2022).

Ainda em relação à metodologia analítica, a técnica empregada pode afetar o valor encontrado, dificultando o estabelecimento do racional necessário para conclusão das etapas 2 e 3. Wichitnithad *et al.* (2023) comentaram sobre essa possibilidade durante a realização de testes confirmatórios em IFAs utilizando diferentes equipamentos. Conforme relatado, considerando metodologias validadas, níveis de NDMA em metformina e ranitidina não foram detectados em equipamento de LC-MS/MS, enquanto nas técnicas de HS-GS/MS e GC-MS foram observados níveis residuais da impureza. A hipótese apresentada é que, devido à utilização de condições cromatográficas de altas temperaturas nos equipamento de HS-GS/MS e GC-MS, os insumos podem ter se convertido de forma imediata à impureza NDMA durante a injeção da amostra (Esquema 3).

Esquema 3 – Representação da degradação de ranitidina e metformina a NDMA.



Fonte: WICHITNITHAD *et al.*, 2023.

De forma similar, Lee *et al.* (2021) reportaram que os níveis “artificiais” de NDMA identificados em insumos como ranitidina, nizatidina e metformina podem aumentar a depender do tempo e temperatura de incubação e armazenamento das amostras, o que corrobora com o que foi observado por Wichitnithad *et al.* Nesse contexto, há necessidade de que os profissionais e especialistas, bem como os órgãos reguladores, estejam constantemente atualizados acerca das mais diversas possibilidades de riscos relacionados – sejam eles reais ou não – à formação de nitrosaminas. Requer-se das partes envolvidas conhecimento detalhado sobre o IFA, processos produtivos do medicamento, impurezas e conhecimento avançado em múltiplas áreas da química. Mesmo assim, conforme evidenciado, a identificação de causas raiz para riscos relacionados à presença de nitrosaminas é um dos principais “efeitos surpresa” do processo de avaliação, pois a cada nova observação e estudo de caso, novas tendências podem ser identificadas (MOSER *et al.*, 2023).

Com relação aos limites de ingestão seguros, enquanto informações sobre toxicidade para nitrosaminas mais comuns estão disponíveis, o cenário não é o mesmo para nitrosaminas mais complexas e NDSRIs, com algumas exceções (SCHLINGEMANN *et al.*, 2022). Dessa forma, recomenda-se cálculo de limites para essas nitrosaminas a partir de utilização do TTC padrão de 18 ng/dia. Essa abordagem

é considerada conservadora, uma vez que nem todas as nitrosaminas – principalmente as NDSRIs – terão potência mutagênica similar a nitrosaminas de estruturas menores, como a *N-Nitrosodiethylamine* (SCHLINGEMANN *et al.*, 2022). Alternativamente, permite-se justificativa de limites superiores a partir de estudos de relação estrutura-atividade (SAR, do inglês *structure-activity relationship*) (EMA, 2020), o que também é dificultoso para nitrosaminas mais complexas, uma vez que dados para estruturas similares também não estariam amplamente disponíveis. Trabalhos recentes têm movido esforços quanto ao entendimento do que seria uma molécula “similar o suficiente” a uma nitrosamina complexa para determinação de uma boa SAR e, portanto, estabelecimento adequado dos limites do composto em questão (SCHLINGEMANN *et al.*, 2022).

Quando possivelmente presentes, é necessário identificar o potencial mutagênico real da(s) impureza(s) nitrosamina(s) em questão. Diferentemente de outras impurezas mutagênicas, um resultado negativo no teste de Ames ainda não é aceito para definir se uma nitrosamina apresenta ou não mutagenicidade (SCHLINGEMANN *et al.*, 2022). Isso ocorre pois é necessária uma etapa de metabolização *in vivo* para que uma nitrosamina se transforme no íon diazônio, e como os procedimentos que mimetizam essa ativação ainda não são robustos, há dúvida razoável com relação ao resultado encontrado.

Com relação a alguns cenários observados envolvendo recolhimento de lotes de medicamentos como medida protetiva à população, estabeleceu-se também a importância de avaliação de impacto quanto a este tipo de ação. O desafio consiste, nesse sentido, em avaliar o quanto a retirada de medicamentos importantes do mercado é benéfica quando há detecção de riscos relacionados à presença de nitrosaminas.

Como exemplo, em 2020 foram notificadas à FDA nitrosaminas em lotes de medicamentos contendo rifampicina e rifapentina, ambos utilizados no tratamento de tuberculose e outras doenças infecciosas graves (FDA, 2020). Diante disso, a agência americana determinou que não iria se opor à permanência desses lotes no mercado, mesmo que acima do limite tomado como ideal à época (0,16 ppm), considerando temporariamente aceitável os limites de 5 ppm para rifampicina e 20 ppm para rifapentina (FDA, 2021). Tal posicionamento evidencia a necessidade de equilíbrio entre os riscos apontados pela indústria farmacêutica – parte regulada – e as medidas tomadas pelas agências reguladoras (MOSER *et al.*, 2023).

Por fim, um desafio bastante importante relacionado à presença de nitritos em excipientes tem sido notado. O risco reside na interação do nitrito oriundo de excipientes, atuando como agente nitrosante, com aminas vulneráveis presentes no IFA ou como impurezas/contaminantes de outras fontes, o que pode ocasionar na formação de nitrosaminas. Além disso, observou-se que aldeídos – impurezas frequentes de diversos excipientes – podem atuar como catalizadores da etapa de nitrosação para a formação de nitrosaminas (HARMON, 2022). Entretanto, em termos quantitativos, pouco se sabe sobre os níveis reais desses compostos em excipientes, o que dificulta não apenas o processo de avaliação de risco, mas também sua mitigação (BOETZEL *et al.*, 2022).

4.3 Perspectivas sobre o tema

Moser *et al.* (2023) evidenciaram uma perspectiva interessante com relação ao olhar regulatório e do mercado para os tipos de nitrosaminas identificados. Após o recolhimento de lotes de valsartana em 2018, as primeiras análises sequenciais quanto ao risco de nitrosaminas para outros IFAs atentavam-se principalmente a pequenas moléculas nitrosaminas, por conta do uso comum de aminas ou amidas na rota síntese, que levavam a estruturas comuns a diversas rotas, como a própria NDMA. Entretanto, ao longo da realização das avaliações de risco e trabalhos investigativos, novos *recalls* não param de ser anunciados e cada vez mais se busca por moléculas complexas, como as NDSRIs (USP, 2022). Evidenciou-se que essas são formadas majoritariamente durante a formulação, quando o IFA possui uma amina secundária na estrutura e há traços de nitritos em excipientes (IPEC, 2022), sendo este último apontado como principal causa raiz (BRAGA, 2022). Além disso, observou-se a possibilidade de haver nitrito na água utilizada ao longo do processo produtivo, o que contribui para a formação de NDSRIs.

Segundo Pathak & Rao (2023), cerca de 41,4% dos IFAs e 30,2% das impurezas de IFAs listadas no GSRS (*Global Substance Registration System*, sistema global de registro de substâncias químicas desenvolvido pela Organização das Nações Unidas), são potenciais precursores de nitrosaminas. Atualmente, sabe-se que, em condições ideais, qualquer IFA contendo uma amina vulnerável e uma fonte de agente nitrosante de forma combinada é um fator de risco para formação de

nitrosaminas (MOSER *et al.*, 2023). Caso não sejam consideradas aminas terciárias como precursores e apenas estruturas com amina secundária reativa sejam levadas em conta, a porcentagem muda para 14,7% e 12,8%, o que ainda é bastante significativo (PATHAK & RAO, 2023).

No passado, a retirada de lotes de medicamento do mercado foi apontada como uma das soluções quando observado risco significativo de formação de nitrosaminas. Entretanto, observou-se que, em análise risco x benefício, a medida não é adequada em sua totalidade de casos. A duração do tratamento, bem como a dosagem do medicamento e o risco de desabastecimento para a população são fatores importantes a serem avaliados nesse sentido. Assim, entendeu-se que a melhor alternativa atual para uma grande maioria de cenários é a otimização do processo produtivo – seja do IFA ou do medicamento – de modo a garantir, na origem, a mitigação dos riscos identificados (MOSER *et al.*, 2023).

Nesse contexto, Akkaraju *et al.* (2023) determinaram as principais estratégias de mitigação de riscos para cada fonte de possível contaminação (Tabela 3):

Tabela 3 – Estratégias de mitigação de risco para cada possível fonte de formação de nitrosaminas.

Fonte	Estratégia(s) de mitigação
Água	- Testagem da água potável usada para fins farmacêuticos quanto à presença de aminas secundárias (como contaminantes) e nitrosaminas. - Emprego de métodos específicos e sensíveis para qualificar e quantificar nitrosaminas
Reagentes e solventes	- Quando possível, evitar aminas secundárias, terciárias ou quaternárias durante a síntese do IFA ou fabricação de formulações. - Ter cuidado quanto ao uso de solventes com amida, tais como N,N-dimetilformamida, N,N-dimetila-cetamida e N-metil pirrolidona. - Empregar agentes de “<i>quenching</i>” alternativos, ou seja, diferentes dos nitritos para decomposição de azida.
Reações químicas	- Evitar e substituir, quando possível, condições de reação que possam produzir nitrosaminas. Por exemplo, presença de aminas secundárias e nitritos em condições ácidas. - Otimizar e controlar consistentemente as sequências e condições de reações de modo a evitar a formação de nitrosaminas.

Fabricação do produto e armazenamento	- Quando possível, evitar o uso de excipientes que sejam amins secundárias. - Adição de antioxidantes como ácido ascórbico ou alfa-tocoferol na formulação. - Introdução de técnica de triagem (<i>screening</i>) de nitrosaminas durante o programa de estabilidade de produtos apontados com risco utilizando métodos analíticos específicos e sensíveis. - Utilização de abordagens estatísticas como <i>Design of Experiments</i> (DoE) para rastreio de formação plausível de nitrosaminas durante a validação do processo.
---------------------------------------	---

Fonte: Adaptado de AKKARAJU *et al.*, 2023.

De forma adicional, diante do risco relacionado à presença de nitritos em excipientes, orienta-se que esse fator também seja considerado durante o planejamento de estratégias para mitigação de risco de nitrosaminas. A partir disso, algumas iniciativas de construção de bases de dados robustas relacionadas à presença de nitritos em excipientes comumente utilizados foram criadas, como a da empresa Lhasa Limited. Essas ferramentas podem ser utilizadas como um componente chave durante a avaliação de risco de nitrosaminas, através das quais Boetzel *et al.* (2022) estabeleceram importantes descobertas:

- O teor médio de nitrito e a variação de lote para lote diferem entre os tipos de excipientes.
- Para a maioria das formulações sólidas, a contribuição de nitrito é dominada pelos excipientes do tipo *bulking agents*, que contêm os níveis mais baixos e menos variáveis de nitrito.
- As diferenças no teor médio de nitrito em lotes de diferentes fornecedores de excipientes indicam diferenças nos materiais de origem ou no processamento.

Conforme já descrito, para classificar uma nitrosamina como impureza não mutagênica, atualmente o resultado negativo obtido em um teste de Ames não é aceito, pois há incertezas sobre a etapa de ativação enzimática dos procedimentos existentes. Nesse sentido, a indústria tem trabalhado na otimização de ensaios *in vitro*, desenvolvendo metodologias robustas que incluam a etapa de ativação enzimática e ainda realizado testes *in vivo* confirmatórios, como sequenciamento duplex, para suportar a não mutagenicidade de uma nitrosamina quando possível (SCHLINGEMANN *et al.*, 2022). Além disso, cálculos robustos de fator de purga tem sido aplicados para dar suporte às análises de risco, ainda que essa seja uma abordagem considerada conservadora e não autossuficiente (USP, 2021).

tem sido defendida no âmbito das nitrosaminas, a exemplo do próprio cálculo do fator de purga já mencionado (BURNS *et al.*, 2020).

5. CONCLUSÃO

As nitrosaminas são impurezas potencialmente carcinogênicas de máxima importância no cenário regulatório atual. Possuem diversos fatores de risco para serem formadas, o que é evidenciado por análises complexas e multidisciplinares quanto à sua presença nos mais diversos tipos de IFAs e produtos acabados.

Nesse cenário, diversos desafios durante o fluxo de análise de risco e implementação de controles adequados têm sido observados. Dificuldades relacionadas à identificação dos fatores de risco em diferentes etapas da produção do IFA e/ou do medicamento, ao desenvolvimento de métodos analíticos – seja pela necessidade de equipamentos especializados como na variedade e complexidade das matrizes, ou ainda à determinação de limites que de fato correspondam a um risco real, são exemplos dos desafios observados.

A partir disso, mudanças no cenário regulatório acompanham as novas descobertas, e se faz importante a atuação conjunta das agências reguladoras a fim de que as diretrizes sejam constantemente atualizadas. Embora o domínio sobre o tema tenha avançado ao longo dos últimos anos, ainda há muito a ser elucidado.

Para o cenário brasileiro, é necessário que o setor regulado se atente continuamente às tendências internacionais, uma vez que essas afetarão as perspectivas nacionais. Desse modo, é garantida a continuidade da segurança dos medicamentos consumidos pela população.

6. REFERÊNCIAS

1. AGLIO, T. C. et al. **N-nitrosaminas em medicamentos: um problema atual, uma realidade antiga.** *Química Nova*, Campinas (SP), Brasil: Vol. 45, No. 8, p. 959-976, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170894>. Acesso em 6 abr. 2023.

2. AKKARAJU, H. et al. **A comprehensive review of sources of nitrosamine contamination of pharmaceutical substances and products.** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, [S.l.]: Volume 139, March 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2023.105355>. Acesso em 8 abr. 2023.
3. ANVISA. **Anvisa adota medidas para garantir a segurança de medicamentos do tipo "sartanas" utilizados no Brasil.** Brasília (DF): 01/22/2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2022/anvisa-esta-adotando-medidas-para-garantir-a-seguranca-de-medicamentos-do-tipo-sartanas-utilizados-no-brasil>. Acesso em 8 abr. 2023.
4. ANVISA. **Guia sobre o Controle de Nitrosaminas em Insumos Farmacêuticos Ativos e Medicamentos.** Brasília (DF): guia nº 50/2021, v. 2, 2022.
5. ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 53, de 7 de dezembro de 2015.** Estabelece parâmetros para a notificação, identificação e qualificação de produtos de degradação em medicamentos com substâncias ativas sintéticas e semissintéticas, classificados como novos, genéricos e similares, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF): 23 out. 2015.
6. ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 166, de 24 de julho de 2017.** Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF): 25 jul. 2017.
7. ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 283, de 17 de maio de 2019.** Dispõe sobre investigação, controle e eliminação de nitrosaminas potencialmente carcinogênicas em antagonistas de receptor de angiotensina II. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF): 22 mai. 2019.
8. ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada nº 677, de 28 de abril de 2022.** Dispõe sobre 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): 04 mai. 2022.
9. BARTSCH, H., MONTESANO, R. **Relevance of nitrosamines to human cancer.** *Carcinogenesis*, [S.l.]: v. 5, n. 11, p. 1381-1386, 1984. Oxford University Press (OUP). Disponível em: <https://doi.org/10.1093/carcin/5.11.1381>. Acesso em 04 mai. 2022.
10. BURNS, M. et al. **Controlling a Cohort: Use of Mirabilis-Based Purge Calculations to Understand Nitrosamine-Related Risk and Control**

- Strategy Options.** *Org. Process Res. Dev.*, [S.I.]: June 30, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00264>. Acesso em 5 mai. 2023.
11. BEARD, J. C., SWAGER, T. M. **An Organic Chemist's Guide to N-Nitrosamines: Their Structure, Reactivity, and Role as Contaminants.** *J. Org. Chem*, [S.I.]: v. 86, n. 3, p. 2037-2057, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.joc.0c02774>. Acesso em 23 abr. 2023.
12. BOETZEL, R. et al. **A Nitrite Excipient Database: A useful Tool to Support N-Nitrosamine Risk Assessments for Drug Products.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, [S.I.]: April 29, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.04.016>. Acesso em 23 abr. 2023.
13. BRAGA, R. **Abordagens Alternativas Para Avaliação De Nitrosaminas.** [S.I.]: 3 fevereiro 2022. Disponível em: <https://insilicall.com/abordagens-alternativas-avaliacao-nitrosaminas/>. Acesso em 23 abr. 2023.
14. EFSA and WHO. **Review of the Threshold of Toxicological Concern (TTC) approach and development of new TTC decision tree.** [S.I.]: 10 March 2016. Disponível em: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/sp.efsa.2016.EN-1006>. Acesso em 12 ago. 2022.
15. EMA. **Nitrosamine impurities in human medicinal products.** [S.I.]: nº EMA/369136/2020, 25 June 2020. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf. Acesso em 23 abr. 2023.
16. EMA. **Questions and answers for marketing authorisation holders/applicants on the CHMP Opinion for the Article 5(3) of Regulation (EC) No 726/2004 referral on nitrosamine impurities in human medicinal products.** [S.I.]: nº EMA/409815/2020, Rev. 15, 2023. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-questions-answers-marketing-authorisation-holders/applicants-chmp-opinion-article-53-regulation-ec-no-726/2004-referral-nitrosamine-impurities-human-medicinal-products_en.pdf. Acesso em 6 abr. 2023.
17. FDA. **FDA Updates and Press Announcements on Nitrosamines in Rifampin and Rifapentine.** [S.I.], 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-nitrosamines-rifampin-and-rifapentine>. Acesso em 23 abr. 2023.

18. FDA. **Guidance for Industry: Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs.** Silver Spring, Maryland (EUA): February 2021. Disponível em: <https://www.fda.gov/media/141720/download>. Acesso em 06 mar. 2023.
19. FDA. **Information about Nitrosamine Impurities in Medications.** [S.I.]: 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/information-about-nitrosamine-impurities-medications>. Acesso em 12 ago. 2022.
20. FDA. **Laboratory analysis of rifampin/rifapentine products.** [S.I.]: 28/01/2021. Disponível em: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/laboratory-analysis-rifampinrifapentine-products>. Acesso em 17 mai. 2023.
21. HARMON, P. **Trace Aldehydes in Solid Oral Dosage Forms as Catalysts for Nitrosating Secondary Amines.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, [S.I.]: Nov 4, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.10.033>. Acesso em 11 mai. 2023.
22. ICH. **Guideline for good clinical practice E6(R2).** [S.I.]: 2016. Disponível em: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-good-clinical-practice-e6r2-step-5_en.pdf. Acesso em 6 mar. 2023.
23. ICH. **Guideline M7(R2) on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk.** [S.I.]: 3 April 2023. Disponível em: https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_M7%28R2%29_Guideline_Step_4_2023_0216_0.pdf. Acesso em 16 mai. 2023.
24. IPEC. **The Role of Excipients in Determining N-Nitrosamine Risks for Drug Products.** Brussels, Belgium: March 2022. Disponível em: <https://www.ipec-europe.org/uploads/publications/202203-if-nitrosamines-position-paper-final-1646123452.pdf>. Acesso em 4 abr. 2023.
25. LEE, D. H. et al. **A solvent-free headspace GC/MS method for sensitive screening of N-nitrosodimethylamine in drug products.** *Anal. Methods* 13, [S.I.]: p. 3402 - 3409, 21 Jun 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/D1AY01036K>. Acesso em 8 abr. 2023.
26. LHASA LIMITED. **Lhasa Carcinogenicity Database.** [S.I.]: 2020. Disponível em: <https://carcdb.lhasalimited.org/carcdbfrontend/#>. Acesso em 6 abr. 2023.

27. LI, Y., HECHT, S. **Metabolic Activation and DNA Interactions of Carcinogenic N-Nitrosamines to Which Humans Are Commonly Exposed.** *Int. J. Mol. Sci.*, [S.I.]: 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms23094559>. Acesso em 6 mar. 2023.
28. MAGEE, P., BARNES, J. **The Production of Malignant Primary Hepatic Tumours in the Rat by Feeding Dimethylnitrosamine.** *Br J Cancer* 10, [S.I.]: p. 114–122, 1956. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/bjc.1956.15>. Acesso em 16 ago. 2022.
29. MONTE, S. **Mechanisms of nitrosamine-mediated neurodegeneration: potential relevance to sporadic Alzheimer's disease.** *J Alzheimers Dis.*, [S.I.]: p. 817-825, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.3233%2FJAD-2009-1098>. Acesso em 6 mar. 2023.
30. MOSER, J. et al. **N-Nitrosamines Impurities in Pharmaceuticals: The Abrupt Challenges that Resulted, the Evolving Science, and the Regulatory Framework.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, [S.I.]: January 23, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2023.01.016>. Acesso em 6 abr. 2023.
31. OMS. **Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins.** *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, Lyon: vol. 94, cap. 4.4, p. 279-313, 2010. Disponível em: <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono94.pdf>. Acesso em 6 mar. 2023.
32. PATAI, S. **The Chemistry of Amino Nitroso and Nitro Compounds and Their Derivatives.** Michigan (EUA): Supplement F, Part 1, p. 1151-1223, 1982. John Wiley & Sons, Inc.
33. PATHAK, R., RAO, B. M. **Nitrosamine Impurities & Nitrosamine Drug Substance-Related Impurities (NDSRIs) - Recent Regulatory Updates.** *Spinco Biotech Cutting Edge*, [S.I.]: February 2023.
34. PONTING, D. J., FOSTER, R. S. **Drawing a Line: Where Might the Cohort of Concern End?** *Org. Process Res. Dev.*, [S.I.]: March 14, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.oprd.3c00008>. Acesso em 23 abr. 2023.
35. ROSE, U. **European Pharmacopoeia Activities on Control of Nitrosamines and other DNA-Reactive Impurities.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, [S.I.]: 15 November 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.11.015>. Acesso em 6 abr. 2023.

36. SCHLINGEMANN, J. et al. **The Landscape of Potential Small and Drug Substance Related Nitrosamines in Pharmaceuticals.** *Journal of Pharmaceutical Sciences*, [S.l.]: November 16, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2022.11.013>. Acesso em 8 abr. 2023.
37. SONG, P., HU, F. **N-nitrosamines in Chinese foods.** *Food and Chemical Toxicology*, [S.l.]: Vol. 26, p. 205-208, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(88\)90120-2](https://doi.org/10.1016/0278-6915(88)90120-2). Acesso em 6 mar. 2023.
38. TEASDALE, et al. **Mutagenic Impurities: Strategies for Identification and Control.** Hoboken, New Jersey (EUA): Ed 1, 2022. John Wiley & Sons, Inc.
39. USP. **Latest nitrosamines recall spotlighting need to control pharmaceutical impurities.** [S.l.]: November 11, 2022. Disponível em: <https://qualitymatters.usp.org/latest-nitrosamines-recall-spotlighting-need-control-pharmaceutical-impurities>. Acesso em 8 abr. 2023.
40. USP. **Nitrosamines Exchange - A knowledge-based community for all-things Nitrosamine.** [S.l.]: Apr. 2021. Disponível em: <https://nitrosamines.usp.org/t/theoretical-purge-factor/69>. Acesso em 6 mai. 2023.
41. WICHITNITHAD, W. et al. **Current status and prospects of development of analytical methods for determining nitrosamine and N-nitroso impurities in pharmaceuticals.** *Talanta*, [S.l.]: Volume 254, 1 March 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.124102>. Acesso em 8 abr. 2023.

20 de junho de 2023

Data



Assinatura do aluno(a)

20 de junho de 2023

Data



Assinatura do orientador(a)