

CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE A HARMONIZAÇÃO DE EXIGÊNCIAS
TÉCNICAS PARA PRODUTOS FARMACÊUTICOS DE USO HUMANO (ICH)

GUIA HARMONIZADO DO ICH

**AVALIAÇÃO E CONTROLE DE IMPUREZAS REATIVAS AO DNA
(MUTAGÊNICAS) EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS PARA
LIMITAR O RISCO CARCINOGENICO EM POTENCIAL**

M7(R1)

Versão atual da *Fase 4*

Datada de 31 de março de 2017

Este Guia foi desenvolvido pelo Grupo de Trabalho apropriado de Peritos do ICH e foi objeto de consulta pelas partes reguladoras, de acordo com o Processo do ICH. Na Fase 4 do Processo, recomenda-se que o texto final seja adotado pelos organismos reguladores das regiões do ICH.

M7(R1)

Histórico do Documento

Código	Histórico	Data
M7	Aprovação pelo Comitê Diretor na <i>Fase 2</i> e liberação para consulta pública.	6 de fevereiro de 2013
M7	Aprovação pelo Comitê Diretor na <i>Fase 4</i> e recomendação para adoção aos três organismos reguladores do ICH.	5 de junho de 2014
M7	Errata para corrigir erros tipográficos e substituir a palavra "degradantes" por "produtos de degradação" em todo o documento.	23 de junho de 2014
Adendo M7(R1)	Aprovação pelos Membros da Assembleia do ICH na <i>Fase 2</i> e liberação para consulta pública.	11 de junho de 2015

Versão atual da *Fase 4*

Adição M7(R1)	Adoção pelos Membros Reguladores da Assembleia do ICH na <i>Fase 4</i> e recomendação para adoção pelos organismos reguladores do ICH.	31 de maio de 2017
---------------	--	--------------------

Aviso legal: Este documento está protegido por direitos autorais e pode ser usado, reproduzido, incorporado em outras obras, adaptado, modificado, traduzido ou distribuído sob uma licença pública, desde que os direitos autorais do ICH no documento sejam sempre reconhecidos. No caso de qualquer adaptação, modificação ou tradução do documento, devem ser tomadas medidas razoáveis para rotular, demarcar ou identificar claramente de outra forma que as alterações foram feitas no documento original ou baseado nele. Deve ser evitada qualquer impressão de que a adaptação, modificação ou tradução do documento original seja endossada ou patrocinada pelo ICH.

O documento é fornecido "como está", sem garantia de qualquer tipo. Em nenhum caso o ICH ou os autores do documento original serão responsáveis por qualquer reclamação, dano ou outra responsabilidade decorrente do uso do documento.

As permissões acima mencionadas não se aplicam ao conteúdo fornecido por terceiros. Portanto, para documentos em que os direitos autorais são de terceiros, é necessário obter permissão de reprodução desse detentor dos direitos autorais.

GUIA HARMONIZADO DO ICH

AVALIAÇÃO E CONTROLE DE IMPUREZAS REATIVAS AO DNA (MUTAGÊNICAS) EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS PARA LIMITAR O RISCO CARCINOGENÉTICO EM POTENCIAL

M7(R1)

Guia Harmonizado do ICH

Tendo atingido a *Fase 4* do Processo do ICH na reunião da Assembleia do ICH em 31 de maio de 2017, recomenda-se a adoção deste Guia às partes reguladoras do ICH.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	ESCOPO DA DIRETRIZ.....	1
3.	PRINCÍPIOS GERAIS.....	2
4.	CONSIDERAÇÕES PARA PRODUTOS COMERCIALIZADOS	3
4.1	Alterações pós-aprovação na química, na fabricação e nos controles do princípio ativo	3
4.2	Alterações pós-aprovação na química, fabricação e controles do medicamento.....	4
4.3	Alterações no uso clínico de produtos comercializados.....	4
4.4	Outras considerações para produtos comercializados	4
5.	AVALIAÇÃO DE IMPUREZA DE PRINCÍPIO ATIVO E MEDICAMENTO	4
5.1	Impurezas sintéticas	5
5.2	Produtos de degradação.....	5
5.3	Considerações para o desenvolvimento clínico.....	6
6.	ELEMENTOS DE AVALIAÇÃO DE PERIGOS	6
7.	CARACTERIZAÇÃO DE RISCOS	7
7.1	Ingestões aceitáveis baseadas em TTC.....	7
7.2	Ingestões aceitáveis com base em avaliações de risco específicas do composto	7
7.2.1	Impurezas mutagênicas com dados positivos de carcinogenicidade (classe 1 na tabela 1)	7
7.2.2	Impurezas mutagênicas com evidências de um limiar prático	8
7.3	Ingestões aceitáveis em relação à exposição LTL.....	8
7.3.1	Desenvolvimento clínico	9
7.3.2	Produtos comercializados.....	9
7.4	Ingestões aceitáveis para múltiplas impurezas mutagênicas	9
7.5	Exceções e flexibilidade nas abordagens	10
8.	CONTROLE.....	10
8.1	Controle de impurezas relacionadas ao processo	11
8.2	Considerações para abordagens de controle.....	12
8.3	Considerações para testes periódicos	12
8.4	Controle de produtos de degradação	13
8.5	Gerenciamento do ciclo de vida	13
8.6	Considerações para o desenvolvimento clínico.....	14
9.	DOCUMENTAÇÃO	14

9.1	Aplicações de estudos clínicos	14
9.2	Documento técnico comum (requerimento de comercialização)	15
	NOTAS.....	15
	GLOSSÁRIO	20
	Referências	22
	APÊNDICES	23
	Apêndice 1: Cenários de escopo para a aplicação da Diretriz ICH M7	23
	Apêndice 2: Exemplos de Casos para Ilustrar Abordagens Potenciais de Controle.....	24
	Apêndice 3: Adenda ao ICH M7	27

AVALIAÇÃO E CONTROLE DE IMPUREZAS REATIVAS AO DNA (MUTAGÊNICAS) EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS PARA LIMITAR O RISCO CARCINOGENICO EM POTENCIAL

M7(R1)

1. INTRODUÇÃO

A síntese de substâncias medicamentosas envolve o uso de produtos químicos, reagentes, solventes, catalisadores e outros auxiliares de processamento que podem ser reativos. Como resultado da síntese química ou subsequente degradação, as impurezas residem em todas as substâncias medicamentosas e medicamentos associados. Embora o Guia Q3A (R2) do ICH: Impurezas em Novas Substâncias Medicamentosas e o Guia Q3B (R2): Impurezas em Novos Medicamentos (Ref. 1, 2) fornecem orientação para qualificação e controle para a maioria das impurezas, há uma orientação limitada para as impurezas reativas ao DNA. O objetivo deste guia é fornecer uma estrutura prática aplicável à identificação, categorização, qualificação e controle dessas impurezas mutagênicas para limitar o risco carcinogênico em potencial. Este guia tem como objetivo complementar os guias Q3A(R2), Q3B(R2) (Nota 1) e M3(R2) do ICH: Estudos Não Clínicos de Segurança para a Condução de Estudos Clínicos em Humanos e Registro para Produtos Farmacêuticos (Ref. 3).

Este guia enfatiza considerações de gerenciamento do risco à segurança e à qualidade no estabelecimento de níveis de impurezas mutagênicas que se esperam que apresentem riscos carcinogênicos desprezíveis. O documento descreve recomendações para avaliação e controle de impurezas mutagênicas que residem ou que se esperam razoavelmente que residam na substância medicamentosa ou medicamento final, levando em consideração as condições pretendidas para o uso humano.

2. ESCOPO DO GUIA

Este documento tem como objetivo fornecer orientação para novas substâncias medicamentosas e novos medicamentos durante seu desenvolvimento clínico e subseqüentes petições de registro. Também se aplica a submissões pós-registro de produtos comercializados e a novas petições de registro para produtos com uma substância medicamentosa que esteja presente em um produto aprovado anteriormente, em ambos os casos somente quando:

- Alterações na síntese da substância medicamentosa resultarem em novas impurezas ou no aumento dos critérios de aceitação para as impurezas existentes;
- Alterações na formulação, composição ou processo de fabricação resultarem em novos produtos de degradação ou no aumento dos critérios de aceitação para produtos de degradação existentes;
- Forem feitas alterações na indicação ou regime de dosagem, o que afeta significativamente o nível aceitável de risco de câncer.

A avaliação do potencial mutagênico de impurezas, conforme descrito neste guia, não se destina aos seguintes tipos de substâncias medicamentosas e medicamentos: biológicos/ biotecnológicos, peptídeos, oligonucleotídeos, radiofármacos, produtos de fermentação, fitoterápicos e produtos crus de origem animal ou vegetal.

Este guia não se aplica a substâncias medicamentosas e medicamentos destinados a indicações de câncer avançado, conforme definido no escopo do Guia S9 (Ref. 4) do ICH. Além disso, pode haver alguns casos em que uma substância medicamentosa destinada a outras indicações seja em si mesma genotóxica em concentrações terapêuticas e pode-se esperar que esteja associada a um risco aumentado de câncer. A exposição a uma impureza mutagênica nesses casos não aumentaria

significativamente o risco de câncer da substância medicamentosa. Portanto, as impurezas poderiam ser controladas em níveis aceitáveis para impurezas não mutagênicas.

A avaliação do potencial mutagênico de impurezas, conforme descrito neste guia, não se destina a excipientes usados em produtos comercializados, agentes aromatizantes, corantes e perfumes existentes. Não se pretende a aplicação deste guia a lixiviáveis associados à embalagem do medicamento, mas os princípios de avaliação do risco à segurança descritos neste guia para limitar o risco carcinogênico em potencial podem ser usados, se for necessário. Os princípios de avaliação do risco à segurança deste guia podem ser usados se necessário para impurezas em excipientes que são usados pela primeira vez em um medicamento e sintetizados quimicamente.

3. PRINCÍPIOS GERAIS

O foco deste guia está nas substâncias medicamentosas reativas ao DNA que têm o potencial de causar danos diretamente ao DNA quando presentes em níveis baixos, levando a mutações e, portanto, potencialmente causando câncer. Esse tipo de agente cancerígeno mutagênico é geralmente detectado em um ensaio de mutação bacteriana reversa (mutagenicidade). Outros tipos de genotóxicos que não são mutagênicos têm tipicamente mecanismos de limiar e, em geral, não apresentam risco carcinogênico em humanos no nível normalmente presente como impurezas. Portanto, para limitar um possível risco de câncer humano associado à exposição a impurezas potencialmente mutagênicas, o ensaio de mutagenicidade bacteriana é usado para avaliar o potencial mutagênico e a necessidade de controles. Avaliações baseadas em estrutura são úteis para prever resultados de mutagenicidade bacteriana com base no conhecimento estabelecido. Existem várias abordagens para conduzir essa avaliação, incluindo uma revisão da literatura disponível e/ ou avaliação computadorizada de toxicologia.

Um conceito de Limiar de Preocupação Toxicológica (TTC, em inglês) foi desenvolvido para definir uma ingestão aceitável para qualquer substância química não estudada que represente um risco desprezível de carcinogenicidade ou outros efeitos tóxicos. Os métodos nos quais o TTC se baseia são geralmente considerados muito conservadores, pois envolvem uma extrapolação linear simples a partir da dose que fornece uma incidência de tumor de 50% (TD₅₀) a uma incidência de 1 em 10⁶, usando dados de TD₅₀ para as espécies mais sensíveis e local mais sensível da indução do tumor. Para a aplicação de um TTC na avaliação de limites aceitáveis de impurezas mutagênicas em substâncias medicamentosas e medicamentos, pode-se justificar um valor de 1,5 µg/dia correspondente a um risco teórico de câncer em excesso de 10⁻⁵ ao longo da vida. Alguns grupos estruturais foram identificados como tendo uma potência tão alta que a ingestão mesmo abaixo do TTC estaria teoricamente associada a um potencial de risco carcinogênico significativo. Esse grupo de agentes cancerígenos mutagênicos de alta potência, chamados de "coorte de preocupação", compreende compostos semelhantes a aflatoxina, N-nitroso- e alquil-azóxicos.

Durante o desenvolvimento clínico, espera-se que as estratégias e abordagens de controle sejam menos desenvolvidas nas fases iniciais, em que a experiência geral de desenvolvimento é limitada. Este guia fornece a base de ingestão aceitável de impurezas mutagênicas em estratégias estabelecidas de avaliação de risco. O risco aceitável durante a fase inicial de desenvolvimento é definido em um nível teoricamente calculado de aproximadamente um câncer adicional por milhão. Para fases posteriores do desenvolvimento e para produtos comercializados, o aumento aceitável do risco de câncer é determinado em um nível teoricamente calculado de aproximadamente um em cem mil. Esses níveis de risco representam um pequeno aumento teórico do risco, quando comparados com a incidência durante toda a vida humana em geral de desenvolver qualquer tipo de câncer, que é maior que 1 em 3. Observa-se que as avaliações estabelecidas de risco de câncer são baseadas nas exposições ao longo da vida. As exposições Menores que a Vida Toda [*Less-Than-Lifetime*] (LTL, em inglês), durante o desenvolvimento e a comercialização, podem ter uma maior ingestão aceitável de impurezas e ainda manter níveis de risco comparáveis. O uso de um valor numérico de risco de câncer (1 em 100.000) e sua tradução em doses baseadas em risco (TTC) é um conceito altamente hipotético que não deve ser

considerado uma indicação realista do risco real. No entanto, o conceito de TTC fornece uma estimativa de exposições seguras para qualquer composto mutagênico. Contudo, exceder o TTC não está necessariamente associado a um maior risco de câncer, dadas as premissas conservadoras empregadas na derivação do valor do TTC. O aumento mais provável na incidência de câncer é realmente muito menor que 1 em 100.000. Além disso, nos casos em que um composto mutagênico é um agente não-cancerígeno em um bioensaio em roedores, não haveria aumento previsto no risco de câncer. Com base em todas as considerações acima, qualquer exposição a uma impureza que é posteriormente identificada como mutagênica não está necessariamente associada a um maior risco de câncer para pacientes já expostos à impureza. Uma avaliação de risco determinaria se quaisquer outras ações seriam tomadas.

Nos casos em que um risco em potencial foi identificado para uma impureza, deve ser desenvolvida uma estratégia apropriada de controle que alavanque a compreensão do processo e/ ou os controles analíticos para garantir que a impureza mutagênica esteja igual ou abaixo do nível aceitável de risco de câncer.

Pode haver casos em que uma impureza também é um metabólito da substância medicamentosa. Nesses casos, a avaliação de risco que aborda a mutagenicidade do metabólito pode qualificar a impureza.

4. CONSIDERAÇÕES PARA PRODUTOS COMERCIALIZADOS

Este guia não se destina a ser aplicado retrospectivamente (ou seja, a produtos comercializados antes da adoção deste guia). No entanto, alguns tipos de alterações pós-registro justificam uma reavaliação da segurança em relação às impurezas mutagênicas. Esta seção se aplica a essas alterações pós-registro para produtos comercializados antes ou depois da adoção deste guia. A Seção 8.5 (Gerenciamento do Ciclo de Vida) contém recomendações adicionais para produtos comercializados após a adoção deste guia.

4.1 Alterações Pós-Registro na Química, na Fabricação e nos Controles da Substância Medicamentosa

As petições pós-registro envolvendo a química, a fabricação e os controles de substâncias medicamentosas devem incluir uma avaliação do possível impacto do risco associado às impurezas mutagênicas, desde alterações na via de síntese, reagentes, solventes ou condições do processo após o material de partida. Especificamente, as alterações devem ser avaliadas para determinar se as alterações resultam em quaisquer novas impurezas mutagênicas ou em critérios de aceitação mais altos para as impurezas mutagênicas existentes. A reavaliação de impurezas não impactadas por mudanças não é recomendada. Por exemplo, quando apenas uma parte do processo de fabricação é alterada, a avaliação do risco a partir de impurezas mutagênicas deve ser limitada a saber se quaisquer novas impurezas mutagênicas resultam dessa alteração, se quaisquer impurezas mutagênicas formadas durante a etapa afetada sofrem aumento e se alguma das impurezas mutagênicas conhecidas das etapas a montante sofrem aumento. As submissões regulatórias associadas a essas alterações devem descrever a avaliação, conforme descrito na Seção 9.2. Alterar o local de fabricação de substância medicamentosa, intermediários ou materiais de partida ou alterar o fornecedor de matérias-primas não exigirá uma reavaliação do risco de impureza mutagênica.

Quando um novo fornecedor de substâncias medicamentosas é proposto, a evidência de que a substância medicamentosa produzida por esse fornecedor usando a mesma via de síntese que um medicamento existente comercializado na região do avaliador é considerada evidência suficiente de risco/ benefício aceitável em relação a impurezas mutagênicas e não é necessária uma avaliação por este guia. Se não for esse o caso, espera-se uma avaliação de acordo com este guia.

4.2 Alterações Pós-Registro na Química, Fabricação e Controles do Medicamento

As petições pós-registro envolvendo o medicamento (por exemplo, alteração na composição, processo de fabricação, forma de dosagem) devem incluir uma avaliação do risco em potencial associado a quaisquer novos produtos de degradação mutagênicos ou um critério de aceitação mais alto para os produtos de degradação mutagênicos existentes. Se apropriado, a submissão regulatória incluiria uma estratégia de controle atualizada. A reavaliação da substância medicamentosa associada a medicamentos não é recomendada ou esperada, desde que não haja alterações na substância medicamentosa. Alterar o local de fabricação do medicamento não exigirá uma reavaliação do risco de impureza mutagênica.

4.3 Alterações no Uso Clínico de Produtos Comercializados

Alterações no uso clínico de produtos comercializados que podem garantir uma reavaliação dos limites de impureza mutagênica incluem um aumento significativo na dose clínica, um aumento na duração do uso (particularmente quando uma impureza mutagênica foi controlada acima da ingestão aceitável ao longo da vida para uma indicação anterior que pode não ser mais apropriado para a duração mais longa do tratamento associada à nova indicação) ou para uma alteração na indicação de uma condição séria ou com risco de vida em que foram justificadas doses aceitáveis mais altas (Seção 7.5) para uma indicação de uma condição menos grave quando as ingestões aceitáveis de impurezas existentes podem não ser mais adequadas. Alterações no uso clínico de produtos comercializados associados a novas vias de administração ou expansão em populações de pacientes que incluem gestantes e/ ou crianças não justificam uma reavaliação, supondo que não haja aumentos na dose diária ou na duração do tratamento.

4.4 Outras Considerações para Produtos Comercializados

A aplicação deste guia pode ser justificada aos produtos comercializados, se houver motivo específico de preocupação. A existência de alertas estruturais de impureza por si só é considerada insuficiente para desencadear medidas de acompanhamento, a menos que seja uma estrutura na coorte de preocupação (Seção 3). No entanto, uma causa específica de preocupação seria novos dados relevantes de risco de impureza (classificados como Classe 1 ou 2, Seção 6) gerados após o estabelecimento da estratégia geral de controle e das especificações para registro. Esses novos dados relevantes sobre riscos de impurezas devem ser derivados de estudos científicos de alta qualidade, consistentes com as diretrizes relevantes de testes regulatórios, com registros ou relatórios de dados prontamente disponíveis. Da mesma forma, uma impureza recém-descoberta que é um mutagênico conhecido de Classe 1 ou Classe 2, presente em um produto comercializado, também pode ser motivo de preocupação. Nos dois casos em que o solicitante toma conhecimento dessas novas informações, uma avaliação deve ser realizada de acordo com este guia.

5. AVALIAÇÃO DE IMPUREZA DE SUBSTÂNCIA MEDICAMENTOSA E MEDICAMENTO

As impurezas reais e potenciais que possam surgir durante a síntese e o armazenamento de uma nova substância medicamentosa e durante a fabricação e o armazenamento de um novo medicamento devem ser avaliadas.

A avaliação da impureza é um processo de duas etapas:

- As impurezas reais que foram identificadas devem ser consideradas por seu potencial mutagênico.
- É realizada uma avaliação das impurezas em potencial que provavelmente estão presentes na substância medicamentosa final para determinar se é necessária uma avaliação adicional do seu potencial mutagênico.

As etapas aplicadas a impurezas sintéticas e produtos de degradação são descritas nas Seções 5.1 e 5.2, respectivamente.

5.1 Impurezas sintéticas

As impurezas reais incluem aquelas observadas na substância medicamentosa acima dos limiares de relato do guia Q3A do ICH. A identificação de impurezas reais é esperada quando os níveis excederem os limites de identificação descritos pelo guia Q3A do ICH. Reconhece-se que algumas impurezas abaixo do limiar de identificação também podem ter sido identificadas.

As impurezas potenciais na substância medicamentosa podem incluir materiais de partida, reagentes e intermediários na via de síntese do material de partida para a substância medicamentosa.

O risco de transmissão para a substância medicamentosa deve ser avaliado quanto a impurezas identificadas que estão presentes nos materiais de partida e intermediários e impurezas que são razoavelmente esperadas como subprodutos na via de síntese a partir do material de partida até a substância medicamentosa. Como o risco de transmissão pode ser desprezível para algumas impurezas (por exemplo, as impurezas em etapas sintéticas iniciais de longas vias de síntese), uma justificativa baseada no risco pode ser fornecida para o ponto da síntese após o qual esses tipos de impurezas devem ser avaliados para potencial mutagênico.

Para materiais de partida que são introduzidos no final da síntese da substância medicamentosa (e onde a via sintética do material de partida é conhecida), as etapas finais da síntese do material de partida devem ser avaliadas quanto a possíveis impurezas mutagênicas.

As impurezas reais onde as estruturas são conhecidas e as impurezas potenciais, conforme definidas acima, devem ser avaliadas quanto ao potencial mutagênico, conforme descrito na Seção 6.

5.2 Produtos de degradação

Os produtos de substâncias medicamentosas reais de degradação incluem aqueles observados acima do limiar de relato do guia Q3A do ICH durante o armazenamento da substância medicamentosa nas condições propostas de armazenamento a longo prazo e nas embalagens primária e secundária. Os produtos de degradação reais no medicamento incluem aqueles observados acima do limite de relato do guia Q3B do ICH durante o armazenamento do medicamento nas condições propostas de armazenamento a longo prazo e nas embalagens primária e secundária, além de incluir as impurezas que surgem durante a fabricação do medicamento. A identificação de produtos de degradação reais é esperada quando os níveis excederem os limites de identificação descritos nos guias Q3A/ Q3B do ICH. Reconhece-se que alguns produtos de degradação abaixo do limite de identificação também podem ter sido identificados.

Os produtos de degradação em potencial na substância medicamentosa e no medicamento são aqueles dos quais se pode esperar razoavelmente que sejam formados durante condições de armazenamento a longo prazo. Os produtos de degradação em potencial incluem aqueles que se formam acima do limiar de identificação dos guias Q3A/B do ICH durante estudos acelerados de estabilidade (por exemplo, 40°C/75% de umidade relativa por 6 meses) e estudos de fotoestabilidade confirmatórios, conforme descrito no guia Q1B do ICH (Ref. 5), mas ainda não foram confirmados na substância medicamentosa ou no medicamento sob condições de armazenamento prolongado na embalagem primária.

O conhecimento de vias de degradação relevantes pode ser usado para ajudar a orientar decisões sobre a seleção de possíveis produtos de degradação a serem avaliados quanto à mutagenicidade, por exemplo, a partir de princípios químicos de degradação, estudos relevantes de teste de estresse e estudos de estabilidade de desenvolvimento.

Os produtos de degradação reais e potenciais que provavelmente estão presentes na substância medicamentosa ou no medicamento final e onde a estrutura é conhecida devem ser avaliados quanto ao potencial mutagênico, conforme descrito na Seção 6.

5.3 Considerações para o desenvolvimento clínico

Espera-se que a avaliação da impureza descrita nas Seções 5.1 e 5.2 se aplique aos produtos em desenvolvimento clínico. No entanto, é reconhecido que as informações disponíveis são limitadas. Por exemplo, informações de estudos de estabilidade a longo prazo e estudos de fotoestabilidade podem não estar disponíveis durante o desenvolvimento clínico e, portanto, as informações sobre produtos de degradação em potencial podem ser limitadas. Além disso, os limiares descritos nos guias Q3A/B do ICH não se aplicam a produtos em desenvolvimento clínico e, conseqüentemente, menos impurezas serão identificadas.

6. ELEMENTOS DE AVALIAÇÃO DE PERIGOS

A avaliação de perigos envolve uma análise inicial das impurezas reais e potenciais, realizando pesquisas em bancos de dados e na literatura para obter dados de carcinogenicidade e mutagenicidade bacteriana, a fim de classificá-las como Classe 1, 2 ou 5, de acordo com a Tabela 1. Se os dados para essa classificação não estiverem disponíveis, deve ser realizada uma avaliação das Relações Estrutura-Atividade (SAR, em inglês) que se concentra nas previsões de mutagenicidade bacteriana. Isso pode levar a uma classificação na Classe 3, 4 ou 5.

Tabela 1: Classificação das Impurezas com Respeito ao Potencial Mutagênico e Carcinogênico e às Conseqüentes Ações de Controle

Classe	Definição	Ação proposta para controle (detalhes nas Seções 7 e 8)
1	Carcinógenos mutagênicos conhecidos	Controle igual ou inferior ao limite aceitável específico do composto
2	Mutagênicos conhecidos com potencial carcinogênico desconhecido (mutagenicidade bacteriana positiva*, sem dados de carcinogenicidade em roedores)	Controle igual ou inferior aos limites aceitáveis (TTC apropriado)
3	Estrutura de alerta, não relacionada à estrutura da substância medicamentosa; sem dados de mutagenicidade	Controle igual ou inferior aos limites aceitáveis (TTC apropriado) ou teste de mutagenicidade bacteriana; Se não-mutagênico = Classe 5 Se mutagênico = Classe 2
4	Estrutura de alerta, o mesmo alerta em substância medicamentosa ou compostos relacionados à substância medicamentosa (por exemplo, intermediários de processo) que foram testados e não são mutagênicos	Tratar como impureza não-mutagênica
5	Nenhum alerta estrutural ou estrutura de alerta com dados suficientes para demonstrar falta de mutagenicidade ou carcinogenicidade	Tratar como impureza não-mutagênica

*Ou outros dados positivos relevantes de mutagenicidade indicativos de indução de mutações genéticas relacionada à reatividade ao DNA (por exemplo, resultados positivos em estudos de mutação genética *in vivo*)

Uma avaliação toxicológica computadorizada deve ser realizada usando metodologias (Q)SAR que predizem o resultado de um ensaio de mutagenicidade bacteriana (Ref. 6). Duas metodologias de previsão de (Q)SAR que se complementam devem ser aplicadas. Uma metodologia deve ser baseada

em regras de especialistas e a segunda metodologia deve ser baseada em estatísticas. Os modelos de (Q)SAR que utilizam essas metodologias de previsão devem seguir os princípios gerais de validação estabelecidos pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE).

A ausência de alertas estruturais a partir de duas metodologias complementares (Q)SAR (baseadas em regras de especialistas e estatísticas) é suficiente para concluir que a impureza não é uma preocupação mutagênica e não se recomendam mais testes (Classe 5 na Tabela 1).

Se garantido, o resultado de qualquer análise baseada em sistema de computador pode ser analisado com o uso de conhecimento especializado, a fim de fornecer evidências adicionais de apoio sobre a relevância de qualquer previsão positiva, negativa, conflitante ou inconclusiva e fornecer uma justificativa para apoiar a conclusão final.

Para acompanhar um alerta estrutural relevante (Classe 3 na Tabela 1), medidas de controle adequadas podem ser aplicadas ou um teste de mutagenicidade bacteriana pode ser conduzido apenas com a impureza. Um ensaio de mutagenicidade bacteriana negativa adequadamente conduzido (Nota 2) anularia qualquer preocupação baseada na estrutura, e nenhuma outra avaliação de genotoxicidade seria recomendada (Nota 1). Essas impurezas devem ser consideradas não mutagênicas (Classe 5 na Tabela 1). Um resultado positivo de mutagenicidade bacteriana justificaria mais avaliações de risco e/ou medidas de controle (Classe 2 na Tabela 1). Por exemplo, quando os níveis de impureza não podem ser controlados em um limite aceitável apropriado, recomenda-se que a impureza seja testada em um ensaio de mutação genética *in vivo*, a fim de entender a relevância do resultado do ensaio de mutagenicidade bacteriana sob condições *in vivo*. A seleção de outros ensaios de genotoxicidade *in vivo* deve ser justificada cientificamente com base no conhecimento do mecanismo de ação da impureza e na exposição esperada ao tecido alvo (Nota 3). Estudos *in vivo* devem ser planejados levando em consideração os Guias do ICH existentes sobre genotoxicidade. Os resultados do ensaio *in vivo* apropriado podem apoiar a fixação de limites de impureza específicos do composto.

Uma impureza com um alerta estrutural compartilhado (por exemplo, o mesmo alerta estrutural na mesma posição e ambiente químico) com a substância medicamentosa ou compostos relacionados pode ser considerada não-mutagênica (Classe 4 na Tabela 1) se o teste desse material no ensaio de mutagenicidade bacteriana foi negativo.

7. CARACTERIZAÇÃO DO RISCO

Como resultado da avaliação de perigo descrita na Seção 6, cada impureza será atribuída a uma das cinco classes da Tabela 1. Para impurezas pertencentes às Classes 1, 2 e 3, os princípios de caracterização do risco usados para derivar ingestões aceitáveis estão descritos nesta seção.

7.1 Ingestões aceitáveis baseadas em TTC

Considera-se que uma ingestão aceitável baseada em TTC de uma impureza mutagênica de 1,5 µg por pessoa por dia está associada a um risco desprezível (risco teórico de câncer em excesso de <1 em 100.000 durante uma vida útil de exposição) e geralmente pode ser usado para a maioria dos produtos farmacêuticos como padrão para derivar um limite aceitável para controle. Essa abordagem geralmente seria usada para impurezas mutagênicas presentes em medicamentos para tratamento a longo prazo (> 10 anos) e quando não houver dados de carcinogenicidade (Classes 2 e 3).

7.2 Ingestões Aceitáveis com Base em Avaliações de Risco Específicas do Composto

7.2.1 Impurezas Mutagênicas com Dados Positivos de Carcinogenicidade (Classe 1 na Tabela 1)

Avaliações de risco específicas do composto para derivar ingestões aceitáveis devem ser aplicadas em vez das ingestões aceitáveis baseadas em TTC, quando existem dados suficientes de carcinogenicidade. Para um carcinógeno mutagênico conhecido, uma ingestão aceitável específica de

composto pode ser calculada com base na potência carcinogênica e extrapolação linear como uma abordagem padrão. Como alternativa, outras práticas de avaliação de risco estabelecidas, como aquelas usadas pelos órgãos reguladores internacionais, podem ser aplicadas para calcular ingestões aceitáveis ou para usar valores já existentes publicados pelas autoridades reguladoras (Nota 4).

Os cálculos específicos de compostos para ingestões aceitáveis podem ser aplicados caso a caso para impurezas quimicamente semelhantes a uma classe de compostos carcinogênicos conhecida (ingestões aceitáveis específicas de classe), desde que seja possível demonstrar uma justificativa para a similaridade química e dados de suporte (Nota 5)

7.2.2 Impurezas Mutagênicas com Evidências para um Limiar Prático

A existência de mecanismos que levem a uma resposta à dose não linear ou com um limiar prático é cada vez mais reconhecida, não apenas para compostos que interagem com alvos não-DNA, mas também para compostos reativos ao DNA, cujos efeitos podem ser modulados por, por exemplo, desintoxicação rápida antes de entrar em contato com o DNA, ou por reparo eficaz dos danos induzidos. A abordagem regulatória para esses compostos pode ser baseada na identificação de um Nível de Efeito Não Observado (NOEL) e no uso de fatores de incerteza (Guia Q3C do ICH (R5), ref. 7) para calcular uma Exposição Diária Permitida (EDP) quando houver dados disponíveis.

As ingestões aceitáveis derivadas de avaliações de risco específicas de compostos (Seção 7.2) podem ser ajustadas para uma duração mais curta do uso nas mesmas proporções definidas nas seções seguintes (Seção 7.3.1 e 7.3.2) ou devem ser limitadas a não mais que 0,5%, o que for menor. Por exemplo, se a ingestão aceitável específica do composto for de 15 µg/dia para a exposição ao longo da vida, os limites inferiores ao tempo de vida (Tabela 2) podem ser aumentados para uma ingestão diária de 100 µg (> 1-10 anos de duração do tratamento), 200 µg (> 1-12 meses) ou 1200 µg (<1 mês). No entanto, para um medicamento com uma dose diária máxima de, por exemplo, 100 mg, a ingestão diária aceitável por <1 mês de duração seria limitada a 0,5% (500 µg) em vez de 1200 µg.

7.3 Ingestões Aceitáveis em Relação à Exposição Menor que a Vida Toda (LTL)

As avaliações de risco padrão de agentes carcinogênicos conhecidos presumem que o risco de câncer aumenta em função da dose cumulativa. Assim, o risco de câncer de uma dose baixa contínua ao longo da vida seria equivalente ao risco de câncer associado a uma exposição cumulativa idêntica, com média de duração mais curta.

A ingestão aceitável baseada em TTC de 1,5 µg/dia é considerada protetora para exposição diária vitalícia. Para abordar as exposições menores que a vida toda (LTL, em inglês) a impurezas mutagênicas em medicamentos, é aplicada uma abordagem na qual a dose cumulativa aceitável ao longo da vida (1,5 µg/dia x 25.550 dias = 38,3 mg) é uniformemente distribuída pelo número total de dias de exposição durante a exposição LTL. Isso permitiria uma maior ingestão diária de impurezas mutagênicas do que seria o caso da exposição ao longo da vida e ainda manteria níveis de risco comparáveis para regimes de tratamento diários e não diários. A Tabela 2 é derivada dos conceitos acima e ilustra as ingestões aceitáveis para menos que a vida toda até exposições ao longo da vida para fins de desenvolvimento clínico e marketing. No caso de dosagem intermitente, a ingestão diária aceitável deve basear-se no número total de dias de dosagem em vez do intervalo de tempo em que as doses foram administradas e esse número de dias de dosagem deve estar relacionado à categoria de duração relevante na Tabela 2. Por exemplo, um medicamento administrado uma vez por semana durante 2 anos (104 dias de dosagem) teria uma ingestão aceitável por dose de 20 µg.

Tabela 2: Ingestões Aceitáveis para uma Impureza Individual

Duração do tratamento	≤ 1 mês	>1 - 12 meses	>1 – 10 anos	> 10 anos até a vida toda
Ingestão diária [µg/dia]	120	20	10	1.5

7.3.1 Desenvolvimento Clínico

Usando esse conceito de LTL (menor que a vida toda), recomenda-se a ingestão aceitável de impurezas mutagênicas por períodos limitados de tratamento durante o desenvolvimento clínico de até 1 mês, 1 a 12 meses e mais de um ano até a conclusão dos estudos clínicos de Fase 3 (Tabela 2). Esses valores aceitáveis ajustados de ingestão mantêm um nível de risco 10^{-6} no desenvolvimento clínico inicial, quando o benefício ainda não foi estabelecido, e um nível de risco 10^{-5} para etapas posteriores do desenvolvimento (Nota 6).

Uma abordagem alternativa ao uso estrito de uma ingestão aceitável ajustada para qualquer impureza mutagênica pode ser aplicada nos estudos clínicos de Fase 1 para dosagem em até 14 dias. Para essa abordagem, apenas as impurezas que são carcinógenos mutagênicos conhecidos (Classe 1) e impurezas mutagênicas conhecidas de potencial carcinogênico desconhecido (Classe 2), bem como as impurezas da classe química da coorte em questão, devem ser controladas (consulte a Seção 8) até limites aceitáveis conforme descrito na Seção 7. Todas as outras impurezas seriam tratadas como impurezas não mutagênicas. Isso inclui impurezas que contêm alertas estruturais (Classe 3), que por si só não desencadeariam ações para uma avaliação por esse período limitado da Fase 1.

7.3.2 Produtos Comercializados

As categorias de duração do tratamento com doses aceitáveis na Tabela 2 para produtos comercializados devem ser aplicadas a durações previstas de exposição para a grande maioria dos pacientes. As ingestões propostas, juntamente com vários cenários para aplicação dessas ingestões, estão descritas na Tabela 4, Nota 7. Em alguns casos, um subconjunto da população de pacientes pode estender o tratamento além do limite superior categórico dos medicamentos comercializados (por exemplo, tratamento superior a 10 anos para uma ingestão aceitável de 10 µg/dia, talvez recebendo 15 anos de tratamento). Isso resultaria em um aumento desprezível (no exemplo dado, um aumento fracionário para 1,5/100.000) em comparação com o risco global calculado para a maioria dos pacientes tratados por 10 anos.

7.4 Ingestões Aceitáveis para Múltiplas Impurezas Mutagênicas

As ingestões aceitáveis baseadas no TTC devem ser aplicadas a cada impureza individual. Quando existem duas impurezas de Classe 2 ou Classe 3, aplicam-se limites individuais. Quando houver três ou mais impurezas Classe 2 ou Classe 3 especificadas na especificação da substância medicamentosa, as impurezas mutagênicas totais devem ser limitadas, conforme descrito na Tabela 3, para desenvolvimento clínico e produtos comercializados.

Para produtos combinados, cada princípio ativo deve ser regulado separadamente.

Tabela 3: Ingestões Diárias Totais Aceitáveis para Várias Impurezas

Duração do tratamento	≤1 mês	>1 - 12 meses	>1 – 10 anos	> 10 anos até a vida toda
Ingestão diária total [µg/dia]	120	60	30	5

Somente as impurezas Classes 2 e 3 especificadas na especificação da substância medicamentosa estão incluídas no cálculo do limite total. No entanto, as impurezas com limites de ingestão aceitáveis específicos de compostos ou relacionados à classe (Classe 1) não devem ser incluídas nos limites totais das impurezas de Classe 2 e Classe 3. Além disso, os produtos de degradação que se formam na substância medicamentosa seriam controlados individualmente e um limite total não seria aplicado.

7.5 Exceções e Flexibilidade nas Abordagens

- Ingestões aceitáveis mais altas podem ser justificadas quando a exposição humana à impureza for muito maior a partir de outras fontes, por exemplo, alimentos ou metabolismo endógeno (por exemplo, formaldeído).
- Exceções caso a caso do uso da ingestão aceitável apropriada podem ser justificadas em casos de doença grave, expectativa de vida reduzida, doença de início tardio mas crônica, ou com alternativas terapêuticas limitadas.
- Compostos de algumas classes estruturais de mutagênicos podem exibir uma potência carcinogênica extremamente alta (coorte de preocupação), isto é, estruturas semelhantes a aflatoxinas, N-nitroso- e alquil-azoxi. Se esses compostos forem encontrados como impurezas em medicamentos, as ingestões aceitáveis para esses agentes carcinogênicos de alta potência provavelmente seriam significativamente menores do que as ingestões aceitáveis definidas neste guia. Embora os princípios deste guia possam ser usados, uma abordagem caso a caso usando, por exemplo, dados de carcinogenicidade a partir de estruturas estreitamente relacionadas, se disponíveis, deve geralmente ser desenvolvida para justificar ingestões aceitáveis para o desenvolvimento farmacêutico e produtos comercializados.

As abordagens de risco acima descritas na Seção 7 são aplicáveis a todas as vias de administração e geralmente não são necessárias correções nas ingestões aceitáveis. Exceções a serem consideradas podem incluir situações em que os dados justificam preocupações específicas da via que devem ser avaliadas caso a caso. Essas abordagens também são aplicáveis a todas as populações de pacientes com base na natureza conservadora das abordagens de risco sendo aplicadas.

8. CONTROLE

Uma estratégia de controle é um conjunto planejado de controles, derivado da compreensão atual do produto e do processo, que garante o desempenho do processo e a qualidade do produto (Guia Q10 do ICH, Ref. 8). Uma estratégia de controle pode incluir, mas não está limitada ao seguinte:

- Controles sobre atributos do material (incluindo matérias-primas, materiais de partida, intermediários, reagentes, solventes, materiais de embalagem primária);
- Condições operacionais das instalações e equipamentos;
- Controles implícitos no planejamento do processo de fabricação;
- Controles em processo (incluindo testes em processo e parâmetros do processo);
- Controles sobre a substância medicamentosa e o medicamento (por exemplo, teste de liberação).

Quando uma impureza é caracterizada como Classes 1, 2 ou 3 na Tabela 1, é importante desenvolver uma estratégia de controle que garanta que o nível dessa impureza na substância medicamentosa e no medicamento esteja abaixo do limite aceitável. Um conhecimento profundo da química associada ao processo de fabricação da substância medicamentosa e do processo de fabricação do medicamento, juntamente com o entendimento da estabilidade geral da substância medicamentosa e do medicamento são fundamentais para o desenvolvimento dos controles apropriados. O desenvolvimento de uma estratégia para controlar impurezas mutagênicas no medicamento é consistente com os processos de gerenciamento do risco identificados no Guia Q9 do ICH (Ref. 9). Uma estratégia de controle baseada no entendimento de produtos e processos e na utilização dos princípios de gerenciamento do risco levará a uma combinação de planejamento e controle de processos e testes analíticos apropriados, que

também podem oferecer uma oportunidade de mudar os controles a montante e minimizar a necessidade de testes em produtos finais.

8.1 Controle de Impurezas Relacionadas ao Processo

Existem 4 abordagens em potencial para o desenvolvimento de uma estratégia de controle para substância medicamentosa:

Opção 1

Incluir um teste para a impureza na especificação da substância medicamentosa com um critério de aceitação igual ou inferior ao limite aceitável, usando um procedimento analítico apropriado.

Para uma abordagem de controle da Opção 1, é possível aplicar testes de verificação periódicos conforme o Guia Q6A do ICH (Ref. 10). O teste de verificação periódica é justificado quando se pode demonstrar que os níveis de impureza mutagênica na substância medicamentosa são inferiores a 30% do limite aceitável para pelo menos 6 escalas piloto consecutivas ou 3 lotes consecutivos de escalas de produção. Se essa condição não for atendida, é recomendado um teste de rotina na especificação da substância medicamentosa. Ver Seção 8.3 para considerações adicionais.

Opção 2

Incluir um teste para a impureza na especificação de uma matéria-prima, material de partida ou intermediário, ou como um controle em processo, com um critério de aceitação igual ou inferior ao limite aceitável, usando um procedimento analítico apropriado.

Opção 3

Incluir um teste para a impureza na especificação de uma matéria-prima, material de partida ou intermediário, ou como um controle em processo, com um critério de aceitação acima do limite aceitável da impureza na substância medicamentosa, usando um procedimento analítico apropriado juntamente com compreensão demonstrada do destino e eliminação e controles de processos associados que garantam que o nível na substância medicamentosa esteja abaixo do limite aceitável, sem a necessidade de testes adicionais posteriormente no processo.

Essa opção pode ser justificada quando o nível de impureza na substância medicamentosa for inferior a 30% do limite aceitável pela análise de dados de experimentos de laboratório em escala (incentivam-se os experimentos de pico) e, quando necessário, apoiados por dados de escala piloto ou lotes de escala comercial. Veja os Exemplos de Caso 1 e 2. Abordagens alternativas podem ser usadas para justificar a Opção 3.

Opção 4

Entender os parâmetros do processo e o impacto nos níveis de impurezas residuais (incluindo conhecimento sobre destino e eliminação) com confiança suficiente de que o nível de impureza na substância medicamentosa estará abaixo do limite aceitável, de modo que nenhum teste analítico seja recomendado para essa impureza (ou seja, a impureza não precisa ser listada em nenhuma especificação).

Uma estratégia de controle que se baseia nos controles do processo, em vez dos testes analíticos, pode ser apropriada se a química do processo e os parâmetros do processo que afetam os níveis de impurezas mutagênicas são compreendidos e o risco de uma impureza residir na substância medicamentosa final acima do limite aceitável é considerado desprezível. Em muitos casos, a justificativa dessa abordagem de controle baseada apenas em princípios científicos é suficiente. Elementos de uma avaliação científica do risco podem ser usados para justificar uma abordagem da opção 4. A avaliação do risco pode ser baseada em propriedades físico-químicas e fatores de processo que influenciam o destino e a eliminação de uma impureza, incluindo reatividade química, solubilidade, volatilidade, ionizabilidade e quaisquer etapas do processo físico projetadas para

remover impurezas. O resultado dessa avaliação do risco pode ser mostrado como um fator de eliminação estimado para a eliminação da impureza pelo processo (Ref. 11).

A opção 4 é especialmente útil para as impurezas que são inerentemente instáveis (por exemplo, cloreto de tionila, que reage rápida e completamente com água) ou para as impurezas que são introduzidas no início da síntese e são efetivamente purgadas.

Em alguns casos, uma abordagem da Opção 4 pode ser apropriada quando se sabe que a impureza se forma ou é introduzida no final da síntese; no entanto, dados específicos do processo devem ser fornecidos para justificar essa abordagem.

8.2 Considerações para Abordagens de Controle

Para as abordagens da Opção 4 em que a justificativa baseada apenas em princípios científicos não é considerada suficiente, bem como para as abordagens da Opção 3, são esperados dados analíticos para apoiar a abordagem de controle. Isso pode incluir informações apropriadas sobre as mudanças estruturais na impureza causadas pela química a jusante ("destino"), dados analíticos em lotes de escala piloto e, em alguns casos, estudos em escala de laboratório com adição intencional da impureza ("estudos de adição"). Nesses casos, é importante demonstrar que o argumento de destino/ eliminação da impureza é forte e garantirá consistentemente uma probabilidade desprezível de uma impureza que resida na substância medicamentosa final acima do limite aceitável. Nos casos em que o fator de eliminação é baseado em dados de desenvolvimento, é importante abordar a dependência ou independência de escala esperada. No caso em que o modelo de pequena escala usado no estágio de desenvolvimento seja considerado como não representando a escala comercial, geralmente é apropriada a confirmação do controle adequado em escala piloto e/ ou lotes comerciais iniciais. A necessidade de dados de lotes piloto/ comercial é influenciada pela magnitude do fator de eliminação calculado a partir de dados de escala laboratorial ou piloto, ponto de entrada da impureza e conhecimento dos pontos de eliminação do processo a jusante.

Se as Opções 3 e 4 não puderem ser justificadas, deveria ser incluído um teste para a impureza na especificação de uma matéria-prima, material de partida ou intermediário, ou como controle em processo (Opção 2) ou substância medicamentosa (Opção 1) no limite aceitável. Para impurezas introduzidas na última etapa sintética, seria esperada uma abordagem de controle da Opção 1, a menos que justificado de outra forma.

A aplicação de "Tão Baixo Quanto Razoavelmente Possível" (ALARP) não é necessária se o nível de impureza mutagênica estiver abaixo dos limites aceitáveis. Da mesma forma, não é necessário demonstrar que vias alternativas de síntese foram exploradas.

Nos casos em que os esforços de controle não puderem reduzir o nível da impureza mutagênica para abaixo do limite aceitável e os níveis são ALARP, um limite mais alto pode ser justificado com base em uma análise de risco/ benefício.

8.3 Considerações para Testes Periódicos

As opções acima incluem situações em que um teste é recomendado para ser incluído na especificação, mas quando a medição de rotina para liberação de cada lote pode não ser necessária. Essa abordagem, chamada de teste periódico ou de salto no Guia Q6A do ICH, também pode ser chamada de "Teste Periódico de Verificação". Essa abordagem pode ser apropriada quando for demonstrado que o processamento subsequente à formação/ introdução da impureza limpa a impureza. Deve-se observar que a permissão para Testes Periódicos de Verificação depende do uso de um processo que esteja sob um estado de controle (ou seja, produz um produto de qualidade que atenda consistentemente às especificações e esteja em conformidade com uma instalação, equipamento, processamento e um regime de controle operacional adequadamente estabelecidos). Se, após o teste, o nível de impureza mutagênica não atender aos critérios de aceitação estabelecidos para o teste

periódico, o produtor do medicamento deve iniciar imediatamente o teste completo (ou seja, o teste de cada lote para o atributo especificado) até que a causa da falha seja determinada de maneira conclusiva, a ação corretiva seja implementada e o processo novamente documentado como estando em um estado de controle. Conforme observado no Guia Q6A do ICH, as autoridades reguladoras devem ser notificadas sobre falhas no teste periódico de verificação para avaliar o risco/ benefício de lotes liberados anteriormente que não foram testados.

8.4 Controle de Produtos de Degradação

Para um produto de degradação em potencial que tenha sido caracterizado como mutagênico, é importante entender se a via de degradação é relevante para os processos de fabricação de substâncias medicamentosas e medicamentos e/ ou suas condições de embalagem e armazenamento propostas. Um estudo de estabilidade acelerado bem planejado (por exemplo, 40°C/75% de umidade relativa, 6 meses) na embalagem proposta, com procedimentos analíticos apropriados, é recomendado para determinar a relevância do produto de degradação em potencial. Como alternativa, podem ser utilizados estudos de estabilidade de curto prazo equivalentes cineticamente bem planejados a temperaturas mais altas na embalagem comercial proposta para determinar a relevância da via de degradação antes de iniciar estudos de estabilidade de longo prazo. Esse tipo de estudo seria especialmente útil para entender a relevância desses produtos de degradação em potencial, baseados no conhecimento de possíveis vias de degradação, mas ainda não observados no produto.

Com base no resultado desses estudos acelerados, se for previsto que o produto de degradação se formará em níveis próximos ao limite aceitável nas condições de embalagem e armazenamento propostas, serão esperados esforços para controlar a formação do produto de degradação. Nesses casos, é esperado o monitoramento do produto de degradação na substância medicamentosa ou no medicamento em estudos a longo prazo de estabilidade primária nas condições de armazenamento propostas (na embalagem comercial proposta), a menos que seja justificado de outra forma. A adequação ou não de um limite de especificação para o produto de degradação mutagênica geralmente dependerá dos resultados desses estudos de estabilidade.

Se for previsto que as opções de planejamento do desenvolvimento de formulação e de embalagem são incapazes de controlar os níveis do produto de degradação mutagênica para menos do que o limite aceitável e os níveis forem tão baixos quanto razoavelmente possível, um limite mais alto pode ser justificado com base em uma análise de risco/ benefício.

8.5 Gerenciamento do Ciclo de Vida

Esta seção se aplica aos produtos aprovados após a publicação deste guia.

Os elementos as responsabilidades de gerenciamento do sistema de qualidade descritos no Guia Q10 do ICH têm como objetivo incentivar o uso de abordagens baseadas em ciência e risco em cada etapa do ciclo de vida, promovendo assim a melhoria contínua em todo o ciclo de vida do produto. O conhecimento do produto e do processo deve ser gerenciado desde o desenvolvimento até a vida comercial do produto, incluindo a descontinuação do produto.

O desenvolvimento e o aprimoramento de uma substância medicamentosa ou processo de fabricação de um medicamento geralmente continua ao longo de seu ciclo de vida. O desempenho do processo de fabricação, incluindo a eficácia da estratégia de controle, deve ser avaliado periodicamente. O conhecimento adquirido com a fabricação comercial pode ser usado para melhorar ainda mais a compreensão e o desempenho do processo e para ajustar a estratégia de controle.

Qualquer alteração proposta no processo de fabricação deve ser avaliada quanto ao impacto na qualidade da substância medicamentosa e do medicamento. Essa avaliação deve basear-se no entendimento do processo de fabricação e determinar se são necessários testes adequados para analisar o impacto das alterações propostas. Além disso, melhorias nos procedimentos analíticos podem levar à

identificação estrutural de uma impureza. Nesses casos, a nova estrutura seria avaliada quanto à mutagenicidade, conforme descrito neste guia.

Durante todo o ciclo de vida do produto, será importante reavaliar se o teste é recomendado quando ocorrem alterações intencionais ou não intencionais no processo. Isso se aplica quando não há monitoramento de rotina no limite aceitável (abordagens de controle da Opção 3 ou Opção 4) ou quando se aplicam testes periódicos em vez de testes lote a lote. Esse teste deve ser realizado em um ponto apropriado no processo de fabricação.

Em alguns casos, o uso do controle estatístico do processo e tendências das medições do processo podem ser úteis para a adequação e a capacidade contínuas dos processos de fornecer controle adequado sobre a impureza. O controle estatístico do processo pode ser baseado em parâmetros do processo que influenciam a formação ou a eliminação de impurezas, mesmo quando essa impureza não é monitorada rotineiramente (por exemplo, Opção 4).

Todas as mudanças devem estar sujeitas a processos internos de gerenciamento de mudanças como parte do sistema de qualidade (Guia Q10 do ICH). Alterações nas informações arquivadas e aprovadas em um dossiê devem ser relatadas às autoridades reguladoras de acordo com os regulamentos e diretrizes regionais.

8.6 Considerações para o Desenvolvimento Clínico

Reconhece-se que o conhecimento do produto e do processo aumenta ao longo do desenvolvimento e, portanto, espera-se que os dados para apoiar as estratégias de controle nas fases dos estudos clínicos de desenvolvimento sejam menores do que na fase de registro. Incentiva-se uma abordagem baseada em risco, com base nos fundamentos da química do processo, para priorizar os esforços analíticos sobre as impurezas com maior probabilidade de estar presente na substância medicamentosa ou no medicamento. Não é de se esperar que os dados analíticos apoiem o desenvolvimento clínico precoce quando a probabilidade de uma impureza estar presente é baixa, mas em uma situação semelhante, os dados analíticos podem ser apropriados para apoiar a abordagem de controle para a petição de registro. Também se reconhece que o planejamento da formulação comercial ocorre posteriormente no desenvolvimento clínico e, portanto, os esforços associados aos produtos de degradação do medicamento serão limitados nas fases anteriores.

9. DOCUMENTAÇÃO

As informações relevantes para a aplicação deste guia devem ser fornecidas nas seguintes etapas:

9.1 Solicitações de Estudos Clínicos

- Espera-se que o número de estruturas avaliadas quanto à mutagenicidade e a coleta de dados analíticos aumentem ao longo do período de desenvolvimento clínico.
- Para estudos da Fase 1 de 14 dias ou menos, deve ser incluída uma descrição dos esforços para mitigar os riscos de impurezas mutagênicas focados nas impurezas de Classe 1 e Classe 2 e naquelas na coorte de interesse, conforme descrito na Seção 7. Para estudos clínicos de Fase 1 com mais de 14 dias e para estudos clínicos de Fase 2a, devem ser incluídas também impurezas de Classe 3 que requerem controles analíticos.
- Para os estudos de desenvolvimento clínico da Fase 2b e Fase 3, uma lista das impurezas avaliadas pelo (Q)SAR deve ser incluída e quaisquer impurezas reais e potenciais de Classe 1, 2 ou 3 devem ser descritas juntamente com os planos de controle. Os sistemas in silico (Q)SAR utilizados para realizar as avaliações devem ser descritos. Os resultados dos testes de mutagenicidade bacteriana das impurezas reais devem ser relatados.
- Argumentos de química podem ser apropriados, em vez de dados analíticos, para impurezas em potencial que apresentem uma baixa probabilidade de presença, conforme descrito na Seção 8.6.

9.2 Documento Técnico Comum (Petição de Registro)

- Para impurezas reais e potenciais relacionadas ao processo e produtos de degradação em que avaliações de acordo com este guia são conduzidas, a classificação da impureza mutagênica e a justificativa para essa classificação devem ser fornecidas:
 - Isso incluiria os resultados e a descrição dos sistemas *in silico* (Q)SAR usados e, conforme o caso, informações de suporte para chegar à conclusão geral para impurezas das Classes 4 e 5.
 - Quando ensaios de mutagenicidade bacteriana forem realizados em impurezas, os relatórios do estudo devem ser fornecidos para ensaios de mutagenicidade bacteriana em impurezas.
- Devem ser fornecidas justificativas para a especificação proposta e a abordagem de controle (por exemplo, exemplo 5b, Ref. 12 do Guia Q11 do ICH). Por exemplo, essas informações podem incluir a ingestão aceitável, a localização e a sensibilidade do monitoramento de rotina relevante. Para as abordagens de controle das Opções 3 e 4, é importante um resumo do conhecimento do fator de eliminação e identificação dos fatores que fornecem controle (por exemplo, etapas do processo, solubilidade em soluções de lavagem etc.).

NOTAS

Nota 1 As recomendações do Guia M7 do ICH fornecem uma abordagem avançada para avaliar o potencial de impurezas para induzir mutações pontuais e garantir que tais impurezas sejam controladas a níveis seguros, de forma que abaixo ou acima do limiar de qualificação do Guia Q3A/B do ICH não seja necessária uma qualificação adicional para o potencial mutagênico. Isso inclui o uso inicial de ferramentas (Q)SAR para prever a mutagenicidade bacteriana. Nos casos em que a quantidade de impurezas exceda 1 mg de dose diária para administração crônica, pode ser considerada a avaliação do potencial genotóxico, conforme recomendado no Guia Q3A/B do ICH. Nos casos em que a quantidade de impurezas é inferior a 1 mg, não é necessário mais nenhum teste de genotoxicidade, independentemente de outros limiares de qualificação.

Nota 2 Para avaliar o potencial mutagênico de impurezas, um único ensaio de mutagenicidade bacteriana pode ser realizado com um protocolo totalmente adequado, de acordo com as orientações nos Guias S2 (R1) do ICH e 471 da OCDE (Ref. 13 e 14). Espera-se que os ensaios sejam realizados em conformidade com os regulamentos de Boas Práticas de Laboratório (BPL); no entanto, a falta de conformidade total com as BPL não significa necessariamente que os dados não possam ser usados para apoiar estudos clínicos e análises de registro. Tais desvios devem ser descritos no relatório do estudo. Por exemplo, o artigo de teste não pode ser preparado ou analisado em conformidade com os regulamentos de BPL. Em alguns casos, a seleção de cepas de testadores bacterianos pode ser limitada àquelas comprovadamente sensíveis ao alerta identificado. Para impurezas que não são viáveis para isolar ou sintetizar ou quando a quantidade de composto é limitada, pode não ser possível atingir as maiores concentrações de teste recomendadas para um ensaio de mutagenicidade bacteriana compatível com o ICH, de acordo com os guias de teste atuais. Nesse caso, o teste de mutagenicidade bacteriana pode ser realizado usando um formato de ensaio miniaturizado com alta concordância comprovada com o ensaio compatível com o ICH para permitir testes em concentrações mais altas com justificativa.

Nota 3 Testes para Investigar a Relevância *in vivo* de Mutagênicos *in vitro* (Mutagenicidade Bacteriana Positiva)

Teste <i>in vivo</i>	Fatores para justificar a escolha do teste como adequado à finalidade
Ensaio de mutação transgênica	<ul style="list-style-type: none"> Para qualquer mutagenicidade bacteriana positiva. Justificar a seleção do tecido/ órgão do ensaio
Ensaio de <i>Pig-a</i> (sangue)	<ul style="list-style-type: none"> Para mutagênicos de ação direta (mutagenicidade bacteriana positiva sem S9) *
Teste de micronúcleo (sangue ou medula óssea)	<ul style="list-style-type: none"> Para mutagênicos de ação direta (mutagenicidade bacteriana positiva sem S9) e compostos conhecidos por serem clastogênicos *
Teste de síntese não programada de DNA (UDS) no fígado de rato	<ul style="list-style-type: none"> Particularmente para mutagenicidade bacteriana positiva com apenas S9 Metabólito hepático responsável conhecido <ul style="list-style-type: none"> a ser gerado nas espécies de teste utilizadas para induzir adutos volumosos
Ensaio Comet	<ul style="list-style-type: none"> Justificativa necessária (modo de ação específico da classe química para formar locais lábeis alcalinos ou quebras de fita simples como dano precedente ao DNA que pode potencialmente levar a mutações) Justificar a seleção do tecido/ órgão do ensaio
Outros	<ul style="list-style-type: none"> Com justificativa convincente

* Para mutagênicos de ação indireta (que requerem ativação metabólica), deve ser demonstrada uma exposição adequada ao(s) metabólito(s).

Nota 4 Exemplo de extrapolação linear do TD₅₀

É possível calcular uma ingestão aceitável específica do composto com base nos dados de potência de carcinogenicidade em roedores, como valores de TD₅₀ (doses que dão uma incidência de tumor de 50% equivalente a um nível de probabilidade de risco de câncer de 1: 2). A extrapolação linear para uma probabilidade de 1 em 100.000 (ou seja, o nível de risco vitalício aceito utilizado) é alcançada simplesmente dividindo o TD₅₀ por 50.000. Esse procedimento é semelhante ao empregado para derivação do TTC.

Exemplo de cálculo: Óxido de etileno

Os valores de TD₅₀ para o óxido de etileno de acordo com a Base de Dados de Potência Carcinogênica são 21,3 mg/kg de peso corporal/dia (rato) e 63,7 mg/kg de peso corporal/dia (camundongo). Para o cálculo de uma ingestão aceitável, é utilizado o valor mais baixo (isto é, mais conservador) do rato.

Para derivar uma dose para causar tumores em 1 em 100.000 animais, divida por 50.000:

$$21,3 \text{ mg/kg}/50.000 = 0,42 \text{ } \mu\text{g/kg}$$

Para derivar uma dose diária total humana:

$$0,42 \text{ } \mu\text{g/kg/dia} \times 50 \text{ kg de peso corporal} = 21,3 \text{ } \mu\text{g/pessoa/dia}$$

Portanto, uma ingestão diária de 21,3 μg de óxido de etileno ao longo da vida corresponderia a um risco teórico de câncer de 10^{-5} e, portanto, seria uma ingestão aceitável quando presente como impureza em uma substância medicamentosa.

Métodos alternativos e limites regulatórios publicados para avaliação de risco de câncer

Como alternativa ao uso do valor TD₅₀ mais conservador dos estudos de carcinogenicidade em roedores, independentemente de sua relevância para os seres humanos, pode ser realizada uma avaliação toxicológica aprofundada dos dados de carcinogenicidade disponíveis para identificar inicialmente os achados (espécie, órgão etc.) com maior relevância para a avaliação de risco humano como base para derivar um ponto de referência para extrapolação linear. Além disso, para melhor considerar diretamente o formato da curva dose-resposta, uma dose de referência, como um Limite de Confiança Inferior à Dose de Referência de 10% (BMDL10, uma estimativa da dose mais baixa, com 95% de certeza de não causar mais que uma incidência de câncer de 10% em roedores) pode ser usada em vez dos valores de TD₅₀ como um índice numérico de potência carcinogênica. A extrapolação linear para uma probabilidade de 1 em 100.000 (isto é, o nível de risco vitalício aceito utilizado) é alcançada simplesmente dividindo o BMDL10 por 10.000.

A ingestão aceitável específica de um composto também pode ser derivada dos valores recomendados publicados de organismos internacionalmente reconhecidos, como a Organização Mundial de Saúde (OMS, Programa Internacional de Avaliação de Risco de Câncer do Programa Internacional de Segurança Química [IPCS]) e outros que utilizam o nível de risco adequado vitalício de 10⁻⁵. Em geral, um limite regulatório aplicado deve basear-se nos dados e/ou metodologia mais atuais e com suporte científico.

Nota 5 Um cálculo específico por composto de ingestões aceitáveis de impurezas mutagênicas pode ser aplicado para impurezas mutagênicas (sem dados de carcinogenicidade) estruturalmente semelhantes a uma classe quimicamente definida de um carcinógeno conhecido. Por exemplo, fatores associados à potência carcinogênica de cloretos de alquila monofuncionais foram identificados (Ref. 15) e podem ser usados para modificar a ingestão aceitável segura de cloretos de alquila monofuncionais, um grupo de cloretos de alquila comumente usados na síntese de medicamentos. Comparados aos cloretos de alquila multifuncionais, os compostos monofuncionais são carcinógenos muito menos potentes, com valores de TD₅₀ variando de 36 a 1810 mg/kg/dia (n = 15; epiclorigrina com dois grupos funcionais distintamente diferentes é excluída). Um valor de TD₅₀ de 36 mg/kg/dia pode, portanto, ser usado como um ponto de referência de potência específico da classe ainda muito conservador para o cálculo de ingestões aceitáveis para cloretos de alquila monofuncionais. Esse nível de potência é pelo menos dez vezes menor que o TD₅₀ de 1,25 mg/kg/dia, correspondente ao TTC vitalício padrão (1,5 µg/dia) e, portanto, justifica a ingestão diária vitalícia e inferior à vida toda para cloretos de alquila monofuncionais dez vezes o padrão.

Nota 6 O estabelecimento de ingestões aceitáveis durante menos que a vida toda para impurezas mutagênicas em medicamentos tem precedente no estabelecimento dos limites de TTC em estágios para o desenvolvimento clínico (Ref. 16). O cálculo das Ingestões Aceitáveis (AI) durante menos que a vida toda é baseado no princípio da regra de Haber, um conceito fundamental em toxicologia em que concentração (C) x tempo (T) = uma constante (k). Portanto, o efeito carcinogênico é baseado na dose e na duração da exposição.

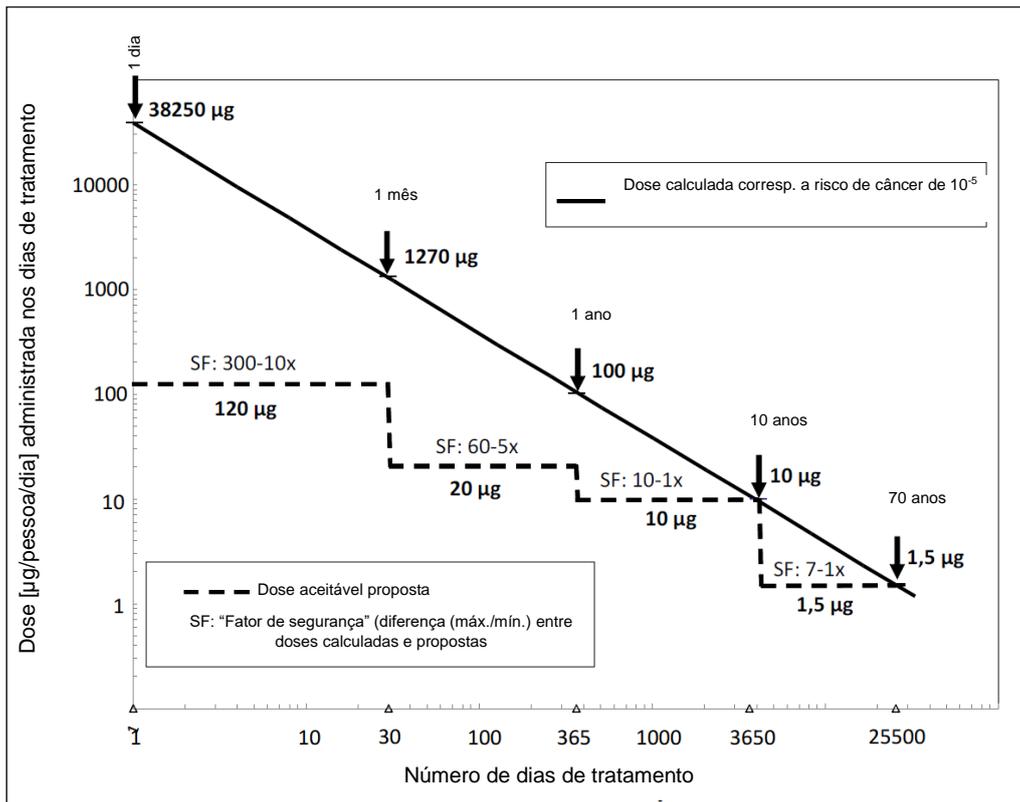


Figura 1: Ilustração da dose diária calculada de uma impureza mutagênica correspondente a um risco teórico de câncer de 1:100.000 como uma função da duração do tratamento em comparação com os níveis aceitáveis de ingestão, conforme recomendado na Seção 7.3.

A linha sólida na Figura 1 representa a relação linear entre a quantidade de ingestão diária de uma impureza mutagênica correspondente a um risco de câncer de 10^{-5} e o número de dias de tratamento. O cálculo é baseado no nível de TTC, conforme aplicado neste guia, para o tratamento ao longo da vida, ou seja, 1,5 µg por pessoa por dia, usando a fórmula:

$$\text{AI menor que a vida útil} = \frac{1,5 \mu\text{g} \times (365 \text{ dias} \times 70 \text{ anos de vida} = 25.550)}{\text{Número total de dias de tratamento}}$$

Os níveis diários de ingestão calculados seriam de 1,5 µg para a duração do tratamento de 70 anos, 10 µg por 10 anos, 100 µg por 1 ano, 1270 µg por 1 mês e aproximadamente 38,3 mg em dose única, todos resultando na mesma ingestão cumulativa e, portanto, teoricamente no mesmo risco de câncer (1 em 100.000).

A curva em forma de degrau tracejada representa os níveis reais de ingestão diária ajustados à exposição inferior à vida toda, conforme recomendado na Seção 7 deste guia para produtos em desenvolvimento clínico e produtos comercializados. Esses níveis propostos são, em geral, significativamente inferiores aos valores calculados, fornecendo fatores de segurança que aumentam com durações mais curtas de tratamento.

As ingestões diárias aceitas propostas também estão em conformidade com um nível de risco de câncer de 10^{-6} , se a duração do tratamento não for superior a 6 meses e, portanto, são aplicáveis nos primeiros estudos clínicos com voluntários/ pacientes em que o benefício ainda não foi estabelecido. Nesse caso, os fatores de segurança mostrados no gráfico superior seriam reduzidos por um fator de 10.

Nota 7 **Tabela 4:** Exemplos de cenários de uso clínico com diferentes durações de tratamento para a aplicação de ingestões aceitáveis

Cenário ¹	Ingestão aceitável (µg/dia)
Duração do tratamento de ≤ 1 mês: por exemplo, medicamentos usados em procedimentos de emergência (antídotos, anestesia, acidente vascular cerebral isquêmico agudo), queratose actínica, tratamento de piolhos	120
Duração do tratamento de > 1-12 meses: por exemplo, terapia anti-infecciosa com tratamento máximo de até 12 meses (HCV), nutrientes parenterais, medicamentos profiláticos para gripe (~ 5 meses), úlcera péptica, tecnologia de reprodução assistida (TARV), trabalho de parto pré-termo, pré-eclâmpsia, tratamento pré-cirúrgico (histerectomia), cicatrização de fraturas (uso agudo, mas com meia-vida longa)	20
Duração do tratamento de > 1-10 anos: por exemplo, estágio da doença com expectativa de vida curta (Alzheimer grave), tratamento anticâncer não genotóxico sendo usado em uma população de pacientes com sobrevida a longo prazo (câncer de mama, leucemia mieloide crônica), medicamentos especificamente rotulados por menos de 10 anos de uso, medicamentos administrados intermitentemente para tratar sintomas recorrentes agudos ² (Herpes crônico, ataques de gota, dependência de substâncias como cessação do tabagismo), degeneração macular, HIV ³	10
Duração do tratamento > 10 anos até a vida toda: por exemplo, indicações de uso crônico com alta probabilidade de uso durante toda a vida em uma faixa etária mais ampla (hipertensão, dislipidemia, asma, Alzheimer (exceto doença de Alzheimer grave), terapia hormonal (por exemplo, hormônio de crescimento, hormônio tireoidiano, hormônio paratireoide), lipodistrofia, esquizofrenia, depressão, psoríase, dermatite atópica, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), fibrose cística, rinite alérgica sazonal e perene	1,5

¹ Essa tabela mostra exemplos gerais; cada exemplo deve ser examinado caso a caso. Por exemplo, 10 µg/dia pode ser aceitável nos casos em que a expectativa de vida do paciente pode ser limitada, por exemplo, doença de Alzheimer grave, mesmo que o uso de medicamentos possa exceder 10 anos de duração.

² O uso intermitente por um período >10 anos, mas com base na dose cumulativa calculada, cai na categoria >1-10 anos.

³ O HIV é considerado uma indicação crônica, mas a resistência se desenvolve aos medicamentos após 5 a 10 anos e a terapia é alterada para outros medicamentos para o HIV.

GLOSSÁRIO

Ingestão aceitável:

No contexto deste guia, um nível de ingestão que apresenta risco desprezível de câncer, ou para indicações sérias/ com risco de vida, em que o risco e o benefício são adequadamente equilibrados.

Limite aceitável:

Concentração máxima aceitável de uma impureza em uma substância medicamentosa ou medicamento, derivada da ingestão aceitável e da dose diária do medicamento.

Critério de aceitação:

Limites numéricos, faixas ou outras medidas adequadas para aceitação dos resultados dos procedimentos analíticos.

Estratégia de controle:

Um conjunto planejado de controles, derivado da compreensão atual do produto e do processo que garante o desempenho do processo e a qualidade do produto. Os controles podem incluir parâmetros e atributos relacionados a substâncias medicamentosas e materiais e componentes de medicamentos, condições operacionais de instalações e equipamentos, controles em processo, especificações de produtos terminados e métodos e frequência associados de monitoramento e controle.

Ingestão cumulativa:

A ingestão total de uma substância à qual uma pessoa é exposta ao longo do tempo.

Produto de degradação: Molécula resultante de uma mudança química na molécula do medicamento provocada ao longo do tempo e/ ou pela ação da luz, temperatura, pH, água ou por reação com um excipiente e/ ou sistema de recipiente/ fechamento imediato.

Reativo ao DNA:

O potencial de induzir danos diretos ao DNA por meio de reação química com o DNA.

Conhecimento especializado:

No contexto deste guia, o conhecimento especializado pode ser definido como uma revisão de dados preexistentes e o uso de qualquer outra informação relevante para avaliar a precisão de uma previsão do modelo *in silico* para mutagenicidade.

Genotoxicidade:

Um termo amplo que se refere a qualquer alteração prejudicial no material genético, independentemente do mecanismo pelo qual a alteração é induzida.

Impureza:

Qualquer componente da substância medicamentosa ou medicamento que não seja a substância medicamentosa ou um excipiente.

Impureza mutagênica:

Uma impureza que foi demonstrada ser mutagênica em um modelo de teste de mutagenicidade apropriado, por exemplo, ensaio de mutagenicidade bacteriana.

Teste de verificação periódica:

Também conhecido como teste periódico ou de salto no Guia Q6A do ICH.

(Q)SAR e SAR:

No contexto deste guia, refere-se à relação entre a (sub) estrutura molecular de um composto e sua atividade mutagênica usando Relações Estrutura-Atividade (Quantitativas) derivadas de dados experimentais.

Fator de eliminação:

A eliminação reflete a capacidade de um processo de reduzir o nível de uma impureza, e o fator de eliminação é definido como o nível de uma impureza em um ponto a montante de um processo dividido pelo nível de uma impureza em um ponto a jusante de um processo. Os fatores de eliminação podem ser medidos ou previstos.

Alerta estrutural:

No contexto deste guia, um agrupamento químico ou (sub) estrutura molecular associado à mutagenicidade.

Referências

1. International Conference on Harmonisation (2006). Q3A(R2): Impurities in New Drug Substances.
2. International Conference on Harmonisation (2006). Q3B(R2): Impurities in New Drug Products.
3. International Conference on Harmonisation (2009). M3(R2): Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals.
4. International Conference on Harmonisation (2009). S9: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals.
5. International Conference on Harmonisation (1996). Q1B: Stability Testing: Photostability Testing of New Drug Substances and Products.
6. Sutter A, Amberg A, Boyer S, Brigo A, Contrera JF, Custer LL, Dobo KL, Gervais V, Glowienke S, van Gompel J, Greene N, Muster W, Nicolette J, Reddy MV, Thybaud V, Vock E, White AT, Müller L (2013). Use of in silico systems and expert knowledge for structure-based assessment of potentially mutagenic impurities. *Regul Toxicol Pharmacol* 2013 67:39-52.
7. International Conference on Harmonisation (2011). Q3C(R5): Impurities: Guideline for Residual Solvents.
8. International Conference on Harmonisation (2008). Q10: Pharmaceutical Quality System.
9. International Conference on Harmonisation (2005). Q9: Quality Risk Management.
10. International Conference on Harmonisation (2000). Q6A: Test Procedures and Acceptance Criteria for New Drug Substances and New Drug Products: Chemical Substances.
11. Teasdale A., Elder D., Chang S-J, Wang S, Thompson R, Benz N, Sanchez Flores I, (2013). Risk assessment of genotoxic impurities in new chemical entities: strategies to demonstrate control. *Org Process Res Dev* 17:221-230.
12. International Conference on Harmonisation (2012). Q11: Development and Manufacture of Drug Substances (Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities).
13. International Conference on Harmonisation (2011). S2(R1): Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use.
14. Test 471. Bacterial Reverse Mutation Test OECD Guideline for Testing of Chemicals Section 4 1997 July
15. Brigo, A. and Müller, L. (2011) Development of the Threshold of Toxicological Concern Concept and its Relationship to Duration of Exposure, in *Genotoxic Impurities* (Ed. A. Teasdale), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. doi: 10.1002/9780470929377.ch2
16. Müller L., Mauthe R.J., Riley C.M., Andino M.M., De Antonis D., Beels C., DeGeorge J., De Knaep A.G.M., Ellison D., Fagerland J.A., Frank R., Fritschel B., Galloway S., Harpur E., Humfrey C.D.N., Jacks A.S.J., Jagota N., Mackinnon J., Mohan G., Ness D.K., O'Donovan M.R., Smith M.D., Vudathala G., Yotti L. (2006). A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Regul Toxicol Pharmacol* 44:198-211.

APÊNDICES

Apêndice 1: Cenários de Escopo para a Aplicação do Guia M7 do ICH

Cenário	Aplica-se à substância medicamentosa	Aplica-se ao Medicamento	Comentários
Registro de novas substâncias medicamentosas e medicamentos associados	Sim	Sim	Propósito primário do Guia M7
Pedidos de estudos clínicos para novas substâncias medicamentosas e medicamentos associados	Sim	Sim	Propósito primário do Guia M7
Pedidos de estudos clínicos para novas substâncias medicamentosas para um medicamento anticâncer de acordo com o Guia S9 do ICH	Não	Não	Fora do escopo do Guia M7
Pedidos de estudos clínicos para novas substâncias medicamentosas para um medicamento órfão	Sim	Sim	Pode haver exceções, caso a caso, para limites mais altos de impureza
Pedido de estudo clínico para um novo medicamento usando uma substância medicamentosa existente, onde não há alterações no processo de fabricação da substância medicamentosa	Não	Sim	A aplicação retrospectiva do Guia M7 não se destina a produtos comercializados, a menos que sejam feitas alterações na síntese. Como não são feitas alterações na síntese da substância medicamentosa, a substância medicamentosa não exigiria reavaliação. Como o medicamento é novo, a aplicação desta diretriz é esperada.
Uma nova formulação de uma substância medicamentosa aprovada é arquivada	Não	Sim	Veja a Seção 4.2
Um produto previamente aprovado em uma região membro é arquivado pela primeira vez em uma região membro diferente. O produto não foi alterado.	Sim	Sim	Como não há reconhecimento mútuo, um produto existente em uma região membro arquivado pela primeira vez em outra região membro seria considerado um novo produto.
Um novo fornecedor ou novo local da substância medicamentosa é registrado. Não há alterações no processo de fabricação usado nessa aplicação registrada.	Não	Não	Desde que a síntese da substância medicamentosa seja consistente com métodos previamente aprovados, a reavaliação do risco de impureza mutagênica não é necessária. O solicitante precisaria demonstrar que nenhuma alteração foi feita em um processo/ produto aprovado anteriormente. Veja a Seção 4.1.

Um produto existente (aprovado após a publicação do Guia M7 do ICH com limites mais altos com base no Guia S9 do ICH) associado a uma indicação para câncer avançado agora está registrado para uso em uma indicação que não ameaça a vida	Sim	Sim	Como a população de pacientes e o risco aceitável de câncer mudaram, a estratégia e os limites de controle de impurezas aprovados anteriormente exigirão reavaliação. Veja a Seção 4.3.
É apresentado um novo produto combinado que contém uma nova substância medicamentosa e uma substância medicamentosa existente	Sim (nova substância medicamentosa) Não (substância medicamentosa existente)	Sim	O Guia M7 se aplicaria à nova substância medicamentosa. Para a substância medicamentosa existente, não se pretende aplicar retrospectivamente o M7 a produtos existentes. Para o medicamento, isso seria classificado como um novo medicamento, de modo que o guia seria aplicado a quaisquer níveis novos ou mais altos de produtos de degradação.

Apêndice 2: Exemplos de Casos para Ilustrar Abordagens Potenciais de Controle

Caso 1: Exemplo de uma Estratégia de Controle da Opção 3

Um intermediário X é formado a dois passos da substância medicamentosa e a impureza A é rotineiramente detectada no intermediário X. A impureza A é um composto estável e é transferida para a substância medicamentosa. Um estudo de pico da impureza A em diferentes níveis de concentração no intermediário X foi realizado em escala laboratorial. Como resultado desses estudos, a impureza A foi removida consistentemente para menos de 30% do limite baseado no TTC na substância medicamentosa, mesmo quando a impureza A estava presente a 1% no intermediário X. Como esse intermediário X é formado a apenas dois passos de distância da substância medicamentosa e o nível da impureza A é relativamente alto, a capacidade de purga do processo também foi confirmada pela determinação da impureza A na substância medicamentosa em vários lotes em escala piloto e os resultados foram inferiores a 30% do limite baseado em TTC. Portanto, o controle da impureza A no intermediário X com um limite de aceitação de 1,0% é justificado e nenhum teste é garantido para essa impureza na especificação da substância medicamentosa.

Caso 2: Exemplo de uma Estratégia de Controle da Opção 3: Com Base na Eliminação Prevista de um Estudo Enriquecido Usando Métodos Analíticos Padrão

Um material de partida Y é introduzido na etapa 3 de uma síntese de 5 etapas e uma impureza B é rotineiramente detectada no material de partida Y a menos de 0,1% usando métodos analíticos padrão. Para determinar se a especificação de 0,1% no material de partida é aceitável, foi realizado um estudo de purga em escala laboratorial, onde a impureza B foi introduzida no material de partida Y com diferentes níveis de concentração de até 10% e um fator de purga > 500 vezes foi determinado nas três etapas finais de processamento. Esse fator de purga aplicado a uma especificação de 0,1% no material de partida Y resultaria em um nível previsto de impureza B na substância medicamentosa de menos de 2 ppm. Como isso está abaixo do limite de 50 ppm com base no TTC para essa impureza na substância medicamentosa, a especificação de 0,1% da impureza B no material de partida Y é justificada sem a necessidade de fornecer dados de lote da substância medicamentosa em lotes de escala piloto ou comerciais.

Caso 3: Exemplo de uma Estratégia de Controle das Opções 2 e 4: Controle de Impurezas Mutagênicas Estruturalmente Semelhantes

O intermediário da etapa 1 de uma síntese em 5 etapas é um composto nitroaromático que pode conter baixos níveis de impureza C, um isômero posicional do intermediário da etapa 1 e também um composto nitroaromático. A quantidade de impureza C no intermediário da etapa 1 não foi detectada

por métodos analíticos comuns, mas pode estar presente em níveis mais baixos. O intermediário da etapa 1 é positivo no ensaio de mutagenicidade bacteriana. A reação de hidrogenação do passo 2 resulta em uma conversão de 99% do intermediário do passo 1 para a amina aromática correspondente. Isso é confirmado através de testes em processo. Uma avaliação da purga do restante do intermediário nitroaromático da etapa 1 foi realizada e um alto fator de purga foi previsto com base nos pontos de purga nas etapas subsequentes de processamento das etapas 3 e 4. Não é esperada purga na etapa 5 do processamento e uma especificação para o intermediário da etapa 1 no limite baseado em TTC foi estabelecida no intermediário da etapa 4 (abordagem de controle da Opção 2). Espera-se que a impureza posicional C do isômero purga através dos mesmos pontos de purga do intermediário da etapa 1 e, portanto, sempre será muito menor que a do intermediário da etapa 1 e, portanto, nenhum teste é necessário, e uma estratégia de controle da Opção 4 para a impureza C pode ser suportado sem a necessidade de quaisquer dados adicionais em escala laboratorial ou piloto.

Caso 4: Exemplo de uma Estratégia de Controle da Opção 4: Impureza Altamente Reativa

O cloreto de tionila é um composto altamente reativo que é mutagênico. Esse reagente é introduzido na etapa 1 de uma síntese de 5 etapas. Em vários pontos da síntese, são usadas quantidades significativas de água. Como o cloreto de tionila reage instantaneamente com a água, não há chance de qualquer cloreto de tionila residual estar presente na substância medicamentosa. Uma abordagem de controle da Opção 4 é adequada sem a necessidade de quaisquer dados em escala de laboratório ou piloto.

Implementação do Guia:

A implementação do M7 é incentivada após a publicação; no entanto, devido à complexidade do guia, não se espera a aplicação do M7 antes de 18 meses após a publicação do ICH.

As seguintes exceções à linha do tempo de 18 meses se aplicam.

1. Os testes de Ames devem ser conduzidos de acordo com o M7 após a publicação do ICH. No entanto, os testes de Ames realizados antes da publicação do M7 não precisam ser repetidos.
2. Quando os programas de desenvolvimento iniciaram os estudos clínicos de fase 2b/3 antes da publicação do M7, esses programas podem ser concluídos até e incluindo a submissão e aprovação da petição de registro, com as seguintes exceções no M7.
 - Não há necessidade de duas avaliações de QSAR, conforme descrito na Seção 6.
 - Não é necessário cumprir o escopo da avaliação da impureza do produto, conforme descrito na Seção 5.
 - Não há necessidade de cumprir as recomendações da documentação descritas na Seção 9.
3. Dados os desafios semelhantes para o desenvolvimento de um processo comercial de fabricação, a aplicação dos aspectos do Guia M7 listados acima para novas petições de registro que não incluem estudos clínicos de Fase 2b/3 não seria esperada até 36 meses após a publicação do M7 pelo ICH.

Apêndice 3: Adendo ao Guia M7 do ICH

Aplicação dos Princípios do Guia M7 do ICH ao Cálculo das Ingestões Aceitáveis Específicas do Composto

ÍNDICE

<u>LISTA DE ABREVIACÕES</u>	28
Introdução.....	30
Métodos.....	32
Ingestões Aceitáveis (AIs) ou Exposições Diárias Permitidas (EDP).....	38
Acrilonitrila (CAS # 107-13-1)	40
Anilina (Nº CAS 62-53-3) e Cloridrato de Anilina (Nº CAS 142-04-1).....	46
Cloreto de benzila (α -clorotolueno, Nº CAS 100-44-7).....	54
Éter bis (clorometil) (BCME, Nº CAS 542-88-1)	60
<i>p</i> -Cloroanilina e HCl de <i>p</i> -cloroanilina - Detalhes dos estudos de carcinogenicidade.....	65
1-Cloro-4-nitrobenzeno - Detalhes dos estudos de carcinogenicidade	70
<i>p</i> -Cresidina - Detalhes dos estudos de carcinogenicidade.....	77
Cloreto de dimetilcarbamilo - Detalhes dos estudos de carcinogenicidade	81
DMS - Detalhes dos estudos de carcinogenicidade.....	85
Cloreto de etila - Detalhes dos estudos de carcinogenicidade.....	88
Glicidol (Nº CAS 556-52-5).....	91
Hidrazina (Nº CAS 302-01-2)	95
Peróxido de hidrogênio (Nº CAS 7722-84-1)	101
Cloreto de Metila (Clorometano, Nº CAS 74-87-3).....	107
Nota 1	111
Nota 2	113
Nota 3	115

LISTA DE ABREVIACÕES

AI	Ingestões Aceitáveis
ATSDR	Agência de Registro de Doenças e Substâncias Tóxicas
BC	Cloreto de Benzila
BCME	Éter bis (clorometil)
BUA	Biodegradável na água em condições aeróbicas
CAC	Comitê de Avaliação do Câncer
CCRIS	Sistema de Informação de Pesquisa sobre Carcinogênese Química
CHL	Linha celular chinesa de fibroblastos de pulmão de hamster
CICAD	Documento Conciso Internacional de Avaliação Química
CIIT	Instituto de Toxicologia da Indústria Química
SNC	Sistema nervoso central
CPDB	Banco de Dados de Potência de Carcinogenicidade
CYP	Citocromo P-450
DMCC	Cloreto de dimetilcarbamilo
DMS	Sulfato de dimetila
DNA	Ácido Nucleico Desoxirribose
CE	Comissão Europeia
ECHA	Agência Europeia de Química
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
EMA	Agência Europeia de Medicamentos
EPA	Agência de Proteção Ambiental
UE	União Europeia
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
HSDB	Banco de Dados de Substâncias Perigosas
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IPCS	Programa Internacional de Segurança Química
IRIS	Sistema Integrado de Informação de Riscos
JETOC	Centro de Informações e Ecologia-Toxicologia da Indústria Química do Japão
JRC	Centro Comum de Pesquisa
LOAEL	Nível de efeito adverso mais baixo observado
DMT	Dose Máxima Tolerada
NA	Não aplicável
NC	Não calculado; incidências individuais de tipos de tumores não fornecidas na OMS,

2002

NCI	Instituto Nacional do Câncer
NOAEL	Nível de efeito adverso não observado
NOEL	Nível de efeito não observado
NSRL	Nenhum nível de risco significativo
NTP	Programa Nacional de Toxicologia
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PCE	Eritrócitos policromáticos
EDP	Exposição Diária Permitida
RfC	Concentração de referência
ROS	Espécies que reagem ao oxigênio
SCCP	Comitê Científico de Produtos de Consumo
SCCS	Comitê Científico de Segurança do Consumidor
SCE	Trocas cromátides irmãs
SIDS	Conjunto de dados de informações de triagem
TBA	Animal com Tumor
TD ₅₀	Taxa de dose crônica em mg/kg de peso corporal/dia, que causaria tumores em metade dos animais no final de uma vida útil padrão para a espécie, levando em consideração a frequência desse tipo de tumor nos animais de controle
Baseado em TTC	Limiar de preocupações toxicológicas
UDS	Síntese de DNA não programada
UNEP	Programa Ambiental das Nações Unidas
US EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
OMS	Organização Mundial da Saúde

Introdução

O Guia M7 do ICH discute a derivação de Ingestão Aceitável (AI) para impurezas mutagênicas com dados positivos de carcinogenicidade (Seção 7.2.1) e afirma: *“Avaliações de risco específicas ao composto para derivar ingestões aceitáveis devem ser aplicadas em vez das baseadas no TTC (Limiar de ingestão aceitável baseada em preocupações toxicológicas) quando existem dados suficientes de carcinogenicidade. Para um carcinógeno mutagênico conhecido, uma ingestão aceitável específica de composto pode ser calculada com base na potência carcinogênica e extrapolação linear como uma abordagem padrão. Como alternativa, outras práticas estabelecidas de avaliação de risco, como aquelas usadas por órgãos reguladores internacionais, podem ser aplicadas para calcular ingestões aceitáveis ou para usar valores já existentes publicados pelas autoridades reguladoras.”*

Neste adendo ao Guia M7 do ICH, AIs ou exposições diárias permitidas (EDPs) foram derivadas para um conjunto de substâncias químicas que são consideradas mutagênicas e carcinogênicas e são comuns na fabricação de medicamentos ou são úteis para ilustrar os princípios para derivar doses específicas de composto descritas no Guia M7 do ICH¹. O conjunto de substâncias químicas inclui compostos nos quais o método primário usado para derivar AIs para agentes carcinogênicos com um provável modo de ação mutagênico é a “abordagem padrão” do Guia M7 do ICH de extrapolação linear da estimativa calculada da potência do câncer, o TD₅₀. Algumas substâncias químicas que são mutagênicas e carcinogênicas (classificadas como Classe 1 no Guia M7 do ICH) podem induzir tumores através de um modo de ação não mutagênico. Portanto, compostos adicionais são incluídos para destacar princípios alternativos à obtenção de doses específicas de composto (isto é, EDP, veja abaixo). Outros compostos (por exemplo, anilina) estão incluídos, embora os dados disponíveis indiquem que eles não são mutagênicos; no entanto, a percepção histórica é de que eles são carcinógenos genotóxicos.

O Guia M7 do ICH declara na Seção 7.2.2: *“A existência de mecanismos que levem a uma resposta à dose não linear ou com um limiar prático é cada vez mais reconhecida, não apenas para compostos que interagem com alvos não-DNA, mas também para compostos reativos ao DNA, cujos efeitos podem ser modulados por, por exemplo, desintoxicação rápida antes de entrar em contato com o DNA, ou por reparo eficaz dos danos induzidos. A abordagem regulatória para esses compostos pode ser baseada na identificação de um Nível de Efeito Não Observado (NOEL) e no uso de fatores de incerteza (Guia Q3C do ICH (R5), ref. 7) para calcular uma Exposição Diária Permitida (EDP) quando houver dados disponíveis.”*

¹ Algumas substâncias químicas estão incluídas cujas propriedades (incluindo reatividade química, solubilidade, volatilidade, ionização) permitem a remoção eficiente durante as etapas da maioria das vias sintéticas, de modo que uma especificação baseada em uma ingestão aceitável não será normalmente necessária.

Exemplos estão incluídos neste Adendo para ilustrar avaliações do modo de ação de alguns produtos químicos de Classe 1 que justificam a derivação de uma EDP calculada usando fatores de incerteza, conforme descrito no guia Q3C (R5) do ICH (Ref. 1). Esses produtos químicos incluem peróxido de hidrogênio, que induz estresse oxidativo, e anilina, que induz tumores secundários à hemossiderose como consequência da metemoglobinemia.

Enfatiza-se que os valores de AI ou EDP apresentados neste Adendo tratam do risco carcinogênico. Outras considerações, como padrões de qualidade, podem afetar as especificações do produto final. Por exemplo, a orientação do guia M7 do ICH (Seção 7.2.2) observa que, ao calcular doses aceitáveis de avaliações de risco específicas de compostos, um limite superior seria de 0,5% ou, por exemplo, 500 µg em um medicamento com uma dose diária máxima de 100 mg.

Métodos

A abordagem geral usada neste adendo para derivar AIs incluiu uma revisão da literatura, seleção da estimativa da potência do câncer [TD₅₀, obtida do CPDB (Carcinogenity Potency Database (Ref. 2)) ou calculada a partir de estudos publicados, usando o mesmo método do CPDB] e, finalmente, o cálculo de uma AI ou EDP apropriada em casos com evidência suficiente para um modo de ação limiar (consulte a Seção 3.). A revisão da literatura enfocou dados relacionados à exposição da população em geral (isto é, alimentos, água e ar), mutagenicidade/ genotoxicidade e carcinogenicidade. Com base na descrição dos mutagênicos reativos ao DNA no guia M7 do ICH, os resultados do teste padrão de mutação bacteriana reversa (teste de Ames) foram usados como critério principal para determinar se um produto químico era mutagênico. Outros dados de genotoxicidade, especialmente *in vivo*, foram considerados na avaliação de um provável modo de ação para a indução de um tumor. Quaisquer valores regulatórios nacionais ou internacionais para níveis aceitáveis de exposição (por exemplo, US EPA, US FDA, EMA, ECHA, OMS) são descritos nas avaliações específicas do composto. As informações de toxicidade de estudos agudos, de dose repetida, reprodutivos, neurológicos e de desenvolvimento não foram revisadas em profundidade, exceto para avaliar as alterações observadas que atuam como um evento precursor carcinogênico (por exemplo, irritação/ inflamação ou metemoglobinemia).

1. Método Padrão

1.1 Modo de ação linear e cálculo da AI

A Nota 4 do guia M7 do ICH declara: *“É possível calcular uma ingestão aceitável específica de um composto com base nos dados de potência de carcinogenicidade em roedores, como valores de TD₅₀ (doses que dão uma incidência de tumor de 50% equivalente a um nível de probabilidade de risco de câncer de 1:2). A extrapolação linear para uma probabilidade de 1 em 100.000 (ou seja, o nível aceito de risco vitalício usado) é alcançada simplesmente dividindo o TD₅₀ por 50.000. Esse procedimento é semelhante ao empregado para derivação do TTC.”*

Assim, considerou-se apropriada a extrapolação linear a partir de um valor de TD₅₀ para derivar uma AI para essas impurezas de Classe 1 (carcinógenos mutagênicos conhecidos) sem "mecanismo de limiar" estabelecido, ou seja, entendimento de um modo de ação que resulta em uma dose não linear - curva de resposta. Em muitos casos, os dados de carcinogenicidade estavam disponíveis no CPDB; as conclusões foram baseadas na opinião dos autores originais do relatório sobre o estudo de carcinogenicidade (“opinião do autor” no CPDB) ou nas conclusões das análises estatísticas fornecidas no CPDB. Quando um valor TD₅₀ pré-calculado foi identificado no CPDB para um produto químico selecionado, esse valor foi usado para calcular a AI; os dados relevantes de carcinogenicidade não foram reanalisados e o valor de TD₅₀ não foi recalculado.

Se houvessem dados robustos disponíveis na literatura, mas não no CPDB, um TD₅₀ foi calculado com base nos métodos descritos no CPDB (Ref. 3). As premissas para peso corporal do animal, volume respiratório e consumo de água para o cálculo de doses foram adotadas a partir dos guias Q3C e Q3D do ICH (Ref. 1, 4).

1.2 Seleção de Estudos

A qualidade dos estudos no CPDB é variável, embora o CPDB imponha critérios de inclusão, como a proporção da vida útil durante a qual os animais de teste foram expostos. Para os fins deste Adendo, critérios adicionais foram aplicados quando os estudos eram de menor qualidade. Estudos de menor qualidade são definidos aqui como aqueles em que um ou mais dos seguintes cenários foram encontrados:

<50 animais por dose e por sexo;

<3 níveis de dose;

Falta de controles simultâneos;

Dosagem intermitente (<5 dias por semana);

Dosagem por menos que a vida útil.

Os estudos mais robustos foram geralmente utilizados para derivar limites. No entanto, estudos que não atenderam a todos os critérios acima foram, em alguns casos, considerados adequados para derivação de uma AI quando outros aspectos do estudo eram robustos, por exemplo, quando o tratamento era realizado por 3 dias por semana (por exemplo, cloreto de benzila), mas havia evidência de que doses mais altas não teriam sido toleradas, ou seja, foi atingida uma Dose Máxima Tolerada (DMT), conforme definida pelo Programa Nacional de Toxicologia (NTP) ou pelo guia S1C (R2) do ICH (Ref. 5). Os cálculos de potência levam em consideração a administração intermitente ou menos do que a vida útil, como a do cloreto de benzila; por exemplo, no CPDB, os níveis de dose mostrados foram ajustados para refletir os níveis diários estimados de dose, de modo que a dose diária dada 3 vezes por semana seja multiplicada por 3/7 para fornecer uma dose diária média; um ajuste comparável será feito se os animais forem tratados por menos de 24 meses. Às vezes, o uso de dados menos robustos pode ser considerado aceitável quando não existem dados mais completos, dada a natureza altamente conservadora da avaliação de riscos em que o TD₅₀ foi linearmente extrapolado para um risco de câncer em excesso de 1 em 100.000. Nesses casos, a justificativa que sustenta a base da abordagem recomendada é fornecida nas avaliações específicas do composto.

1.3 Seleção de Tumor e Local

O TD₅₀ mais baixo de um local de órgão específico para uma espécie e sexo do animal foi selecionado a partir dos estudos mais robustos. Quando existe mais de um estudo, o CPDB fornece uma TD₅₀ média harmônica calculada, mas neste adendo o TD₅₀ mais baixo foi considerado uma estimativa mais conservadora. Os dados compilados como "todos os animais portadores de tumor" (TBA, em inglês) não foram considerados na seleção de um TD₅₀ apropriado do CPDB; tipos de tumores mistos (por exemplo, adenomas e carcinomas) em um tecido (por exemplo, fígado) foram usados quando apropriado, pois isso geralmente fornece uma estimativa mais sensível de potência.

1.4 Via de administração

A Seção 7.5 do guia M7 do ICH declara: *“As abordagens de risco acima descritas na Seção 7 são aplicáveis a todas as vias de administração e geralmente não são necessárias correções nas ingestões aceitáveis. Exceções a serem consideradas podem incluir situações em que os dados justificam preocupações específicas da via que devem ser avaliadas caso a caso.”*

Neste adendo, quando dados robustos estavam disponíveis em estudos de carcinogenicidade para mais de uma via e os locais do tumor não pareciam ser específicos da via, o TD₅₀ da via com o menor valor de TD₅₀ foi selecionado para o cálculo da AI e, portanto, é geralmente considerado adequado para todas as vias. Exceções podem ser necessárias caso a caso; por exemplo, no caso de um potente carcinógeno no local de contato, pode ser necessária uma AI ou EDP específica da via. Outras toxicidades, como a irritação, também podem limitar a AI para uma determinada via, mas apenas a tumorigenicidade é considerada neste adendo semelhante ao guia M7. Aqui, se os tumores eram considerados específicos do local (por exemplo, exposição por inalação, resultando em tumores do trato respiratório sem tumores nos locais distais) e o TD₅₀ era menor do que em outras vias, uma AI separada foi desenvolvida para essa via (por exemplo, cloreto de dimetil carbamoil, hidrazina).

1.5 Cálculo da AI do TD₅₀

O cálculo da AI a partir do TD₅₀ é o seguinte (consulte a Nota 4 do guia M7 do ICH, por exemplo):

$$AI = TD_{50}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

O ajuste de peso assume um peso corporal adulto arbitrário para qualquer sexo de 50 kg. Esse peso relativamente baixo fornece um fator de segurança adicional em relação aos pesos padrão de 60 kg ou 70 kg, frequentemente usados nesse tipo de cálculo. Reconhece-se que alguns pacientes adultos pesam menos de 50 kg; esses pacientes são considerados acomodados pelo conservadorismo inerente (isto é, extrapolação linear do local do órgão mais sensível) usado para determinar uma AI.

2. Consideração de métodos alternativos para o cálculo da AI

2.1 Relevância humana de tumores

A Nota 4 do guia M7 do ICH declara: *“Como alternativa ao uso do valor TD₅₀ mais conservador dos estudos de carcinogenicidade em roedores, independentemente de sua relevância para os seres humanos, uma avaliação toxicológica aprofundada dos dados de carcinogenicidade disponíveis pode ser feita para identificar inicialmente os achados (espécie, órgão etc.) com a maior relevância para a avaliação de risco humano como base para derivar um ponto de referência para extrapolação linear.”*

A relevância humana dos dados de carcinogenicidade disponíveis foi considerada para derivar AIs. Os efeitos em roedores associados a toxicidades que ocorrem com uma resposta não linear à dose não são relevantes para os seres humanos em concentrações baixas e não tóxicas associadas a uma impureza farmacêutica. Por exemplo, no caso da *p*-cloroanilina, o local mais sensível para indução do tumor era o baço, mas esses tumores estavam associados à hemossiderose, considerada um modo de ação com uma resposta não linear à dose e, portanto, não é relevante para humanos em doses baixas que não induzem hemossiderose. No caso da *p*-cloroanilina, os tumores hepáticos, com um TD₅₀ maior, foram utilizados para a extrapolação linear para calcular a AI, porque um modo de ação mutagênico não pôde ser descartado para os tumores hepáticos. Uma segunda categoria de tumores considerados não relevantes para os seres humanos são os tumores associados a um modo de ação específico para roedores, por exemplo, cloreto de metila, com diferença de espécies no metabolismo.

2.2 Limites regulatórios publicados

A Nota 4 do guia M7 do ICH também declara: *“As doses aceitáveis específicas de compostos também podem ser derivadas de valores recomendados publicados de organismos reconhecidos internacionalmente, como a Organização Mundial da Saúde (Programa de Avaliação de Risco de Câncer do Programa Internacional de Segurança Química (IPCS) da Organização Mundial da Saúde) e outros que utilizam o nível de risco adequado vitalício 10⁻⁵. Em geral, um limite regulatório aplicado deve ser baseado nos dados e/ou na metodologia mais atuais e com suporte científico.”*

Neste Adendo, os limites regulatórios disponíveis são descritos (omitindo os limites de saúde ocupacional, pois são tipicamente regionais e podem usar diferentes níveis de risco). No entanto, a extrapolação linear conservadora do TD₅₀ foi geralmente usada como o método primário para derivar a AI, como a abordagem padrão do guia M7 do ICH e para consistência entre os compostos. Reconhece-se que pequenas diferenças na metodologia para avaliação do risco de câncer podem resultar em diferentes limites recomendados (por exemplo, ajustar a área da superfície corporal nos cálculos), mas as diferenças são geralmente bastante pequenas quando a extrapolação linear é a base do cálculo.

3. Modo de ação não linear (limiar) e cálculo da EDP

O guia M7 do ICH declara na Seção 7.2.2: *“A existência de mecanismos que levam a uma resposta à dose não linear ou com um limite prático é cada vez mais reconhecida, não apenas para compostos que interagem com alvos que não são de DNA, mas também para compostos reativos ao DNA, cujos efeitos podem ser modulados, por exemplo, por desintoxicação rápida antes de entrar em contato com o DNA ou por reparo efetivo de danos induzidos. A abordagem regulatória para esses compostos pode ser baseada na identificação de um nível de efeito não observado (NOEL) e no uso de fatores de incerteza (consulte o guia Q3C (R5) do ICH) para calcular uma exposição diária permitida (EDP) quando houver dados disponíveis.”*

Um exemplo de um produto químico reativo ao DNA para o qual foi proposto um limiar de mutagenicidade *in vitro* e *in vivo* é o metanossulfonato de etila (Ref. 6, 7). Um cálculo de EDP usando fatores de incerteza, em vez de extrapolação linear, é apropriado nos casos em que um limiar foi estabelecido.

Essa abordagem de limiar foi considerada apropriada nas avaliações específicas de compostos para agentes carcinogênicos com modos de ação (Seção 2.1) que não têm relevância humana em doses baixas, com base em sua associação com uma resposta não linear à dose para indução de tumor:

Produtos químicos que induzem metahemoglobinemia, depósitos de hemossiderina em tecidos como baço e inflamação e tumores subsequentes (por exemplo, anilina e compostos relacionados);

As informações de suporte incluem evidências de que a mutagenicidade não era central para o modo de ação, como evidência fraca de mutagenicidade, por exemplo, anilina; e/ ou falta de correlação entre locais ou espécies em que se observou genotoxicidade *in vivo* (como adutos de DNA) e indução de tumores.

Produtos químicos que induzem tumores associados a irritação/ inflamação local (como tumores em pré-estômago de roedores) e são agentes carcinogênicos no local de contato podem ser considerados não relevantes para a exposição humana em concentrações baixas e não irritantes como impurezas em potencial em produtos farmacêuticos (por exemplo, cloreto de benzila);

Produtos químicos que atuam por meio de danos oxidativos, para que efeitos deletérios não ocorram em doses mais baixas, pois existem abundantes mecanismos de proteção endógena (por exemplo, peróxido de hidrogênio).

Níveis aceitáveis de exposição a agentes carcinogênicos com um modo de ação limiar foram estabelecidos pelo cálculo das EDP. A metodologia EDP é explicada em mais detalhes no guia Q3C (R5) do ICH (Ref. 1) e no guia Q3D do ICH (Ref. 4).

4. Limite aceitável com base na exposição no ambiente, por exemplo, na dieta

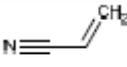
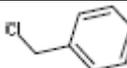
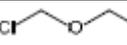
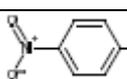
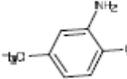
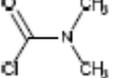
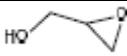
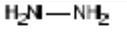
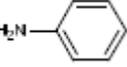
Conforme observado na Seção 7.5 do guia M7 do ICH, "*Ingestão aceitável mais elevada pode ser justificada quando a exposição humana à impureza for muito maior a partir de outras fontes, por exemplo, alimentos ou metabolismo endógeno (por exemplo, formaldeído)*".

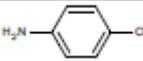
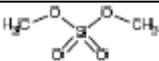
Por exemplo, o formaldeído não é carcinogênico por via oral, de modo que os limites regulatórios foram baseados em parâmetros não relacionados ao câncer. A Health Canada (Ref. 8), o IPCS da OMS (Ref. 9) e a Agência de Proteção Ambiental dos EUA [*US Environmental Protection Agency*] (EPA) (Ref. 10) recomendam um limite oral de 0,2 mg/kg/dia ou 10 mg/dia para uma pessoa de 50 kg.

Referências

1. International Conference on Harmonisation (2011). Q3C(R5): Impurities: Guideline for Residual Solvents
2. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
3. Carcinogenicity Potency Database (CPDB): [Online]. Available from: URL: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/td50.html>
4. International Conference on Harmonisation (2014). Q3D: Impurities: Guideline for Elemental Impurities
5. International Conference on Harmonisation (2008). S1C(R2): Dose Selection for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals
6. Müller L, Gocke E, Lave T, Pfister T. Ethyl methanesulfonate toxicity in Viracept-A comprehensive human risk assessment based on threshold data for genotoxicity. *Toxicol Lett* 2009;190:317-29.
7. Cao X, Mittelstaedt RA, Pearce MG, Allen BC, Soeteman-Hernández LG, Johnson GE, et al. Quantitative dose-response analysis of ethyl methanesulfonate genotoxicity in adult gpt-delta transgenic camundongo. *Environ Mol Mutagen* 2014;55:385-99.
8. Health Canada. 2001 Priority substances list assessment report: Formaldehyde. Ottawa. Ministry of Public Works and Government Services. February. [Online]. Available from: URL: http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/contaminants/psl2-lsp2/index_e.html
9. World Health Organization (WHO). International Programme on Chemical Safety (IPCS). 2002. Concise International Chemical Assessment Document 40. Formaldehyde. [Online]. Available from: URL: <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad40.pdf>
10. US Environmental Protection Agency. Integrated Risk Information System (IRIS). [Online]. 1990; Available from: URL: <http://www.epa.gov/iris/>

Ingestões Aceitáveis (AIs) ou Exposições Diárias Permitidas (EDP)

Composto	Nº CAS	Estrutura Química	AI ou EDP (µg/dia)	Comentário
Extrapolção linear de TD₅₀				
Acrlonitrila	107-13-1		6	Extrapolção linear de TD ₅₀
Cloreto de benzilo	100-44-7		41	Extrapolção linear de TD ₅₀
Éter bis (clorometil)	542-88-1		0,004	Extrapolção linear de TD ₅₀
1-Cloro-4-nitrobenzeno	100-00-5		117	Extrapolção linear de TD ₅₀
<i>p</i> -cresidina	120-71-8		45	Extrapolção linear de TD ₅₀
Cloreto de dimetilcarbamoilo	79-44-7		5 0,6 (inalaçõ)*	Extrapolção linear de TD ₅₀
Cloreto de etilo	75-00-3		1.810	Extrapolção linear de TD ₅₀
Glicidol	556-52-5		4	Extrapolção linear de TD ₅₀
Hidrazina	302-01-2		39 0,2 (inalaçõ)*	Extrapolção linear de TD ₅₀
Cloreto de Metila	74-87-3	Cl-CH ₃	1.361	Extrapolção linear de TD ₅₀
EDP baseada em limiar				
Anilina	62-53-3		720	EDP baseada no modo de açõ limiar (hemossiderose)
HCl de Anilina	142-04-1			
Exposiçõ endógena e/ ou ambiental				
Peróxico de hidrogênio	7722-84-1	HO—OH	68.000 ou 0,5%, o que for menor	68 mg/dia é 1% da produçõ endógena estimada
Outros Casos				

Composto	Nº CAS	Estrutura Química	AI ou EDP (µg/dia)	Comentário
<i>p</i> -Cloroanilina HCl de <i>p</i> -Cloroanilina	106-47-8 20265-96-7		34	AI baseada em tumores hepáticos para os quais o modo de ação mutagênico não pode ser descartado
Sulfato de dimetilo	77-78-1		1,5	Dados de carcinogenicidade disponíveis, mas inadequados para derivar a AI. Padrão para TTC

* Limite específico da via

Acrilonitrila (N° CAS 107-13-1)

Potencial de exposição humana

Não há dados disponíveis para a exposição da população em geral.

Mutagenicidade/ Genotoxicidade

A acrilonitrila é mutagênica e genotóxica *in vitro* e potencialmente positiva *in vivo*.

O Documento Conciso Internacional de Avaliação Química da Organização Mundial da Saúde (OMS) (CICAD, Ref. 1) forneceu uma avaliação completa dos riscos da acrilonitrila. Nessa publicação, o metabolismo oxidativo foi indicado como uma etapa crítica para a acrilonitrila exercer efeitos genotóxicos, implicando o óxido de cianoetileno como um metabólito reativo ao DNA. Uma revisão detalhada dos testes de genotoxicidade em uma variedade de sistemas é fornecida (Ref. 1) com referências; portanto, apenas algumas conclusões importantes são resumidas aqui.

A acrilonitrila é mutagênica em:

Ensaio de mutação microbiana reversa (Ames) em *Salmonella typhimurium* TA 1535 e TA 100 somente na presença de rato ou hamster S9 e em várias cepas de *Escherichia coli* na ausência de ativação metabólica;

Linfoblastos humanos e células de linfoma de camundongo, reproduzíveis com S9, em alguns casos sem S9;

Células T esplênicas de ratos expostos via água potável.

Os estudos de genotoxicidade *in vivo* são negativos ou inconclusivos e os relatórios de ligação ao DNA são consistentemente positivos no fígado, mas apresentam resultados conflitantes no cérebro.

Carcinogenicidade

A acrilonitrila é classificada pela IARC como um agente carcinogênico do Grupo 2B, possivelmente carcinogênico para humanos (Ref. 2).

A acrilonitrila é um agente carcinogênico de múltiplos órgãos em camundongos e ratos, com o cérebro sendo o principal órgão alvo em ratos. Existem quatro estudos de carcinogenicidade oral citados no CPDB (Ref. 3) e os resultados de três estudos orais adicionais estão resumidos na Ref. 1. Desses sete estudos, apenas um é negativo, mas este estudo testou apenas uma dose única administrada por um período curto (Ref. 4).

O estudo do NCI/NTP (National Cancer Institute) no CPDB de acrilonitrila em camundongos (Ref. 5) foi selecionado para derivação da AI oral, com base no desenho robusto do estudo e no valor mais conservador do TD₅₀. Nesse estudo de 2 anos, 3 doses de acrilonitrila foram administradas por gavagem oral em camundongos machos e fêmeas. Houve aumentos estatisticamente significativos nos tumores da glândula Harderiana e do pré-estômago.

No estudo de Quast et al. (Ref. 6), de 1980, citado no CPDB como um relatório da Dow Chemical, parece que o TD₅₀ mais sensível é para astrocitomas em ratas (5,31 mg/kg/dia). No entanto, esse mesmo estudo foi posteriormente descrito em detalhes (Ref. 7) e as doses calculadas nesse relatório publicado são maiores do que as listadas no CPDB. Quast (Ref. 7) descreve a derivação de doses em mg/kg/dia das concentrações de água potável de 35, 100 e 300 ppm, ajustando o peso corporal e a diminuição do consumo de água no estudo. O TD₅₀ para astrocitomas derivado desses números é de 20,2 mg/kg/dia para machos e 20,8 para fêmeas, em contraste com os valores calculados no CPDB de 6,36 e 5,31 mg/kg/dia. (Os TD₅₀ calculados a partir das estimativas de dose de Quast (Ref. 7) para tumores no pré-estômago também são mais altos que os do CPDB com base no mesmo estudo,

conforme mostrado na Tabela abaixo). São descritos tumores no Sistema Nervoso Central (SNC) (Ref. 7), mas o TD₅₀ mais sensível foi para tumores estomacais, conforme mostrado na Tabela abaixo.

Os estudos considerados menos robustos incluíram três estudos sobre água potável em ratos. O maior estudo (Ref. 8) incluiu cinco grupos tratados com acrilonitrila com 100 animais por dose e 200 animais controle, mas sacrifícios em série de 20 animais por grupo de tratamento ocorreram aos 6, 12, 18 e 24 meses. Os resumos de dados da OMS (Ref. 1) e da US EPA (Ref. 9) apresentam incidência de tumores com base em dados de todos os momentos combinados. Portanto, a incidência de tumores relatada pode ser uma subestimação do total de tumores que seria observado se todos os animais fossem mantidos em estudo por 2 anos. Dois estudos (Ref. 10, 11) tinham apenas dois níveis de dose e não são relatados tipos de tumores individuais (Ref. 1), embora tenham sido observados tumores no estômago, na glândula Zymbal e no cérebro.

A acrilonitrila também foi estudada pela via inalatória. Cinquenta ratos por sexo e dose foram expostos por 2 anos aa acrilonitrila, e tumores cerebrais foram observados (Ref. 12). Esse estudo, no entanto, testou apenas 2 níveis de dose. Os outros estudos de inalação foram deficientes em número de animais por grupo, duração da exposição ou administração de uma dose única, embora tenham sido observados tumores cerebrais.

Acrilonitrila - Detalhes dos estudos de carcinogenicidade

Estudo	Grupo de dose/animais	Duração/exposição	Controles	Doses	Local / tipo / sexo do tumor mais sensível	TD₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 5*	50 B6C3F1 Camundongo (F)	2 anos Gavagem	50	3: 1,79;7,14; 14,3 mg/kg/d	Pré-estômago	6,77 ⁺
	50 B6C3F1 Camundongo (M)	2 anos Gavagem	50	3: 1,79;7,14; 14,3 mg/kg/d	Pré-estômago	5,92 ⁺
Ref. 6	~50 SD Ratos Spartan (F)	2 anos Água potável	~80	3: 2,00;5,69; 15,4 mg/kg/d	Astrocitoma	5,31 ⁺⁺ (20,8)
	~50 SD Ratos Spartan (M)	2 anos Água potável	~80	3: 1,75;4,98; 14,9 mg/kg/d	Estômago, não glandular	6,36 ⁺⁺ (9,0)
Ref 7 (relatório de Ref. 6)	~50 SD Ratos Spartan fêmeas	2 anos Água potável	~80	3: 4,4;10,8; 25 mg/kg/d	Estômago, não glandular	19,4
	~50 SD Ratos Spartan machos	2 anos Água potável	~80	3: 3,4;8,5; 21,3 mg/kg/d	Estômago, não glandular	9,0
Ref. 8 [¥]	100 ratos machos	~2 anos Água potável	~200	5: 0,1-8,4 mg/kg/d	Astrocitoma cerebral	(22,9) ⁺

Estudo	Grupo de dose/animais	Duração/exposição	Controles	Doses	Local / tipo / sexo do tumor mais sensível	TD ₅₀ (mg/kg/d)
	100 ratos fêmeas	~2 anos Água potável	~200	5: 0,1-10,9 mg/kg/d	Astrocitoma cerebral	(23,5) ⁺
Ref. 11 [¥]	100/ Ratos sexo	19-22 meses Água potável	~98	2: ~0,09; 7,98 mg/kg/d	Estômago, glândula de Zymbal, cérebro, medula espinhal	NC
Ref. 10 [¥]	50/ Ratos sexo	18 meses Água potável	Não	2: 14;70 mg/kg/d	Cérebro, glândula de Zymbal, pré-estômago	NC [^]
Ref. 13	20 CD ratos machos	2 anos Água potável	Não	3: 1; 5; 25 mg/kg/d	Glândula de Zymbal	30,1
Ref. 4	40/ SD ratos sexo	1 ano 3d/semana Gavagem	75/sexo	1: 1,07 mg/kg/d	Neg em ambos os sexos	NA
Ref. 12	100/ SD ratos Spartan sexo	2 anos 6h/dia; 5d/semana Inalação	~100	2: M: 2,27; 9,1 F: 3,24; 13,0 mg/kg/d	Astrocitoma cerebral Masculino	32,4
Ref. 4	30/ SD ratos sexo	1 ano 5d/semana Inalação	30	4: M: 0,19; 0,38; 0,76; 1,52 F: 0,27;0,54;1,0; 2,17 mg/kg/d	Glioma cerebral Masculino	19,1
Ref. 4	54 SD ratos fêmeas	2 anos 5d/semana Inalação	60	1: 11,1 mg/kg/d	Glioma cerebral	(132) ^ψ

Os estudos listados estão no CPDB (Ref. 3), salvo indicação em contrário.

Os valores de TD₅₀ representam o TD₅₀ do local do tumor mais sensível.

Os valores de TD₅₀ entre parênteses são considerados menos confiáveis, conforme explicado nas notas de rodapé.

* Estudo de carcinogenicidade selecionado para o cálculo da AI; no CPDB.

[^]NC = Não calculado, considerando que incidências individuais de tipo de tumor não foram fornecidas na OMS (Ref. 1).

⁺TD₅₀ calculado com base na incidência de astrocitoma implicado como o local mais significativo pela OMS (Ref. 1). A amostragem serial reduziu o número de animais expostos por 2 anos; portanto, a incidência de tumores pode estar subestimada.

⁺⁺Retirado do CPDB. Observe que, com base nos cálculos de dose realizados pelo autor (ref. 7), o TD₅₀ para astrocitomas e tumores estomacais em ratos Spartan (20,8 e 9,0) é superior aos do CPDB.

NA = Não aplicável.

[¥]Não está no CPDB. Resumido nas refs. 1 e 9.

^ψEstudo em nível de dose única.

Modo de ação para carcinogenicidade

Embora o mecanismo da carcinogênese permaneça inconclusivo, uma contribuição da interação do DNA não pode ser descartada (Ref. 1). Tumores do SNC foram observados em vários estudos de

carcinogenicidade em ratos, além de tumores no pré-estômago; os tumores no pré-estômago também foram o tipo de tumor mais sensível em camundongos.

Os tumores de pré-estômago estão associados à irritação e inflamação local, e Quast (Ref. 7) observa a associação típica entre esses tumores em ratos e hiperplasia e/ ou disqueratose, com outras alterações inflamatórias e degenerativas. Os tumores de pré-estômago em roedores que receberam altas concentrações por via oral, um tipo de efeito do local de contato, podem não ser relevantes para a exposição humana em baixas concentrações que não são irritantes (Ref. 14). A acrilonitrila não é apenas um agente carcinogênico no local de contato. Foram observados tumores no SNC, além de tecidos provavelmente expostos diretamente, como o trato gastrointestinal e a língua. Os tumores de pré-estômago foram observados após a administração de acrilonitrila a ratos em água potável e a camundongos por gavagem. A AI para acrilonitrila foi derivada com base em tumores de pré-estômago em ratos.

Limites regulatórios e/ ou publicados

A EPA dos EUA (Ref. 9) calculou um fator de inclinação oral de 0,54/mg/kg/dia e um limite de água potável de 0,6 µg/L no nível de risco de 1/100.000, com base na ocorrência de tumores em múltiplos órgãos em um estudo da água potável em ratos. Esse limite de água potável equivale a uma dose diária de ~ 1 µg/dia para um ser humano de 50 kg.

Ingestão aceitável (AI)

Fundamentação da seleção do estudo para o cálculo da AI

Estão disponíveis estudos de inalação e orais (gavagem e água potável). Os tumores no SNC foram observados pelas duas vias de administração, e a acrilonitrila é rapidamente absorvida por todas as vias de exposição e distribuída por todos os tecidos examinados (Ref. 1), de modo que uma AI específica por inalação não foi considerada necessária. Todos os estudos de carcinogenicidade utilizados pela US EPA (Ref. 9) na derivação do limite de água potável para acrilonitrila foram revistos ao selecionar o estudo de carcinogenicidade mais robusto para a derivação de uma AI. O estudo do NCI/NTP (Ref. 5) foi selecionado para calcular a AI com base no TD₅₀ derivado da administração de acrilonitrila por gavagem oral em camundongos machos e fêmeas, já que o tipo de tumor com o TD₅₀ mais baixo foi o de tumores de pré-estômago em camundongos machos, com um valor de TD₅₀ de 5,92 mg/kg/dia. Conforme discutido na Seção Métodos 2.2, a extrapolação linear do TD₅₀ foi usada aqui para derivar a AI, e espera-se que pequenas diferenças na metodologia possam resultar em diferentes limites calculados; assim, a AI calculada abaixo para possíveis impurezas farmacêuticas é um pouco maior do que a derivada pela US EPA (Ref. 9) para água potável.

Cálculo de AI

$$\text{AI vitalícia} = \text{TD}_{50}/50.000 \times 50\text{kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 5,92 \text{ (mg/kg/dia)}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = \mathbf{5,9 \mu\text{g/dia (6 \mu\text{g/dia})}}$$

Referências

1. World Health Organization (WHO). Concise International Chemical Assessment Document (CICAD) 39. Acrylonitrile. [Online]. Geneva. 2002; Available from: URL: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad39.htm>
2. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. Acrylonitrile 1999; Vol. 71, 43.
3. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
4. Maltoni C, Ciliberti A, Cotti G, Perino G. Long-term carcinogenicity bioassays on acrylonitrile administered by inhalation and by ingestion to Sprague-Dawley rats. Annals of the New York Academy of Sciences 1988;534:179–202.
5. National Toxicology Program (NTP) Toxicology and Carcinogenesis Studies of Acrylonitrile (CAS No. 107-13-1) in B6C3F1 Camundongo (Sonda Studies). NTP TR 506 NIH Publication No. 02-4440. 2001;198.
6. Quast JF, Wade CE, Humiston CG, Carreon RM, Hermann EA, Park CN et al, Editors. A Two-Year Toxicity and Oncogenicity Study with Acrylonitrile Incorporated in the Drinking Water of Rats, Final Report. Dow Chemical USA, Midland, MI; 1980.

7. Quast, JF Two-year toxicity and oncogenicity study with acrylonitrile incorporated in the drinking water of rats. *Toxicol Lett* 2002;132:153-96.
8. Bio/Dynamics Inc. Monsanto Company. 1980. A twenty-four month oral toxicity/carcinogenicity study of acrylonitrile administered in the drinking water to Fischer 344 rats. Final report. Four volumes. St. Louis, MO. Project No. 77-1744; BDN- 77-27.
9. US EPA. Acrylonitrile (CAS# 107-13-1). Integrated Risk Information System (IRIS) [Online].1987. Available from: URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=206
10. Bigner DD, Bigner SH, Burger PC, Shelburne JD, Friedman HS. Primary brain tumors in Fischer 344 rats chronically exposed to acrylonitrile in their drinking water. *Food and Chemical Toxicology* 1986;24:129–37.
11. Bio/Dynamics Inc. Monsanto Company, Division of Biology and Safety evaluation. 1980. A twenty-four month oral toxicity/carcinogenicity study of acrylonitrile administered to Rats Spartan in the drinking water. Final report. Two volumes. St. Louis, MO. Project No. 77-1745; BDN-77-28.
12. Quast JF, Schuetz DJ, Balmer MF, Gushow TS, Park CN, McKenna MJ, editors. A Two- Year Toxicity and Oncogenicity Study with Acrylonitrile Following Inhalation Exposure of Rats, Final Report. Dow Chemical USA, Midland, MI; 1980.
13. Gallagher GT, Maull EA, Kovacs K, Szab S. Neoplasms in rats ingesting acrylonitrile for two anos. *J Am Col Toxicol* 1988;7:603-15.
14. Proctor DM, Gatto NM, Hong SJ, Allamneni KP. Mode-of-action framework for evaluation of the relevance of rodent pré-estômago tumors in cancer risk assessment. *Toxicol. Sci* 2007;98:313-26.

Anilina (N° CAS 62-53-3) e Cloridrato de Anilina (N° CAS 142-04-1)

Potencial de exposição humana

A anilina ocorre naturalmente em alguns alimentos (por exemplo, milho, grãos, feijão e chá), mas a maior fonte de exposição ocorre em ambientes industriais.

Mutagenicidade/ genotoxicidade

A anilina não é mutagênica no ensaio de mutação reversa microbiana (Ames) na *Salmonella*. A anilina está incluída neste adendo devido à percepção histórica de que a anilina é um carcinógeno genotóxico, uma vez que alguns testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* são positivos.

A anilina não é mutagênica nas 5 linhagens padrão de *Salmonella* ou no *E. coli* WP2 *uvrA*, com ou sem S9 (Ref. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8).

A anilina foi positiva no ensaio *tk* de células L5178Y de linfoma de camundongo com e sem S9 em concentrações bastante elevadas, como 0,5 a 21 mM (Ref. 9, 10, 11).

Os testes de aberração cromossômica deram resultados mistos, com alguns relatos negativos e alguns resultados positivos em linhas celulares de hamster em concentrações citotóxicas muito elevadas, por exemplo, cerca de 5 a 30 mM, com ou sem ativação metabólica de S9 (Ref. 1, 12, 13, 14 15).

In vivo, as aberrações cromossômicas não aumentaram na medula óssea de camundongos CBA machos após duas doses diárias intraperitoneais (i.p.) de 380 mg/kg (Ref. 16), mas foi relatado um pequeno aumento nas aberrações cromossômicas 18 horas após uma dose oral de 500 mg/kg para ratos PVR machos (Ref. 17).

A maioria dos estudos de indução de micronúcleo é positiva na medula óssea após tratamento oral ou i.p. para camundongos (Ref. 18, 19, 20, 21) ou ratos (Ref. 17, 22), e mais comumente em doses elevadas acima de 300 mg/kg. A exposição da dieta a 500, 1000 e 2000 ppm por 90 dias foi associada a aumentos nos micronúcleos no sangue periférico de camundongos B6C3F1 machos e fêmeas (Ref. 23).

In vivo, foi observado um fraco aumento nas trocas de cromátides irmãs (SCE), atingindo um aumento máximo de 2 vezes em relação aos antecedentes, na medula óssea de camundongos Swiss machos 24 horas após uma única dose i.p. de 61 a 420 mg/kg de anilina (Ref. 24, 25). As quebras de cadeia de DNA não foram detectadas na medula óssea do camundongo pelo ensaio de eluição alcalina nesse estudo.

Carcinogenicidade

A anilina é classificada pelo IARC como Grupo 3, não classificável quanto à sua carcinogenicidade em seres humanos (Ref. 4).

Inicialmente, acreditava-se que os cânceres de bexiga em humanos que trabalham na indústria de corantes estivessem relacionados à exposição à anilina, mas posteriormente foram atribuídos a exposições a intermediários na produção de corantes de anilina, como a β -naftilamina, benzidina e outras aminas.

O Instituto de Toxicologia da Indústria Química (CIIT, Ref. 26) realizou um estudo em que o cloridrato de anilina foi administrado na dieta por 2 anos a ratos CD-F (130 ratos/sexo/grupo) nos níveis de 0, 200, 600, e 2000 ppm. Foi observada uma incidência aumentada de sarcomas esplênicos primários em ratos machos apenas no grupo de doses elevadas. Esse estudo foi selecionado para derivação da EDP para anilina com base no planejamento robusto do estudo com 3 grupos de doses e um tamanho grande de grupo (130/sexo/grupo).

Os resultados do estudo do CIIT são consistentes com os do estudo de dieta do Instituto Nacional do Câncer dos EUA [*US National Cancer Institute*] (Ref. 27) do cloridrato de anilina, no qual ratos machos tiveram aumentos nos hemangiossarcomas em múltiplos órgãos, incluindo o baço, e uma tendência significativa relacionada à dose na incidência de feocromocitoma maligno. Em camundongos (Ref. 27), não foi observado aumento estatisticamente significativo de qualquer tipo de tumor em doses muito elevadas.

A anilina em si não induziu tumores em ratos quando testada em um desenho de estudo menos robusto (Ref. 28).

Anilina e HCl de Anilina - Detalhes dos estudos de carcinogenicidade

Estudo	Grupo de dose/Animais	Duração/Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/sexo mais sensível do tumor	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 26* HCl de Anilina	130/sexo/ grupo, ratos CD-F	2 anos Dieta	130	3: 200, 600 e 2000 ppm na dieta (M; 7,2; 22; 72 mg/kg/d)	Sarcoma do baço (dose elevada). NOEL em dose baixa	Não informado
Ref. 27** HCl de Anilina	50/sexo/ grupo, ratos F344	103 semanas (estudo de 107 a 110 semanas) Dieta	50	2: 3000 e 6000 ppm na dieta (F: 144; 268 M: 115; 229 mg/kg/d)	Hemangiossarco- ma do baço/ machos	160 (Macho)
Ref. 27** HCl de Anilina	50/sexo/ grupo camundongo B6C3F1	103 semanas (estudo de 107 a 110 semanas) Dieta	50	2: 6000 e 12000 ppm na dieta (F: 741; 1500 M: 693; 1390 mg/kg/d)	Negativo	NA
Ref. 28** Anilina	10-18/grupo, ratos Wistar machos	80 semanas Dieta	Sim	3: 0,03, 0,06 e 0,12% na dieta (15; 30; 60 mg/kg/d)	Negativo	NA

* Estudo de carcinogenicidade selecionado para o cálculo da EDP. Não está no CPDB.

** Retirado do CPDB (Ref. 29). Os valores de TD₅₀ representam o TD₅₀ do local mais sensível do tumor. NA = Não aplicável

Modo de ação para carcinogenicidade

Em estudos com animais, a anilina causou metahemoglobinemia e hemólise em doses elevadas, a última das quais poderia levar indiretamente a aumentos nos micronúcleos pela indução de eritropoiese (Ref. 19, 30, 31). Os micronúcleos são induzidos em ratos e camundongos, enquanto os tumores induzidos por anilina são observados em ratos, mas não em camundongos, aumentando a evidência de que a genotoxicidade não é essencial para o modo de ação dos tumores induzidos por anilina.

A toxicidade induzida pela anilina no baço parece ser um fator contribuinte para sua carcinogenicidade por meio da formação de radicais livres e lesão tecidual (Ref. 32). Doses elevadas (> 10 mg/kg) de anilina levam ao acúmulo de ferro no baço, resultante da ligação preferencial da anilina aos glóbulos vermelhos e células danificadas que se acumulam no baço. O estresse oxidativo mediado pelo ferro no baço parece induzir a peroxidação lipídica, adutos de malondialdeído-proteína, oxidação de proteínas e regulação positiva do Fator de Crescimento Transformador-β 1, todos detectados no baço de rato após a

exposição à anilina (Ref. 33). O aumento do estresse oxidativo pode ser um evento contínuo durante a exposição crônica à anilina e pode contribuir para a hiperplasia celular, fibrose e tumorigênese observadas em ratos (Ref. 32, 34). A falta de tumorigenicidade em camundongos pode ser devida à toxicidade menos grave observada no baço em comparação com a observada em ratos (Ref. 17, 35).

Para apoiar esse modo de ação induzido por toxicidade para carcinogenicidade, a resposta à dose para a tumorigenicidade induzida por anilina em ratos é não linear (Ref. 36). Ao considerar os estudos do NCI e do CIIT que usaram a mesma linhagem de rato, não foram observados tumores quando o cloridrato de anilina foi administrado na dieta a uma concentração de 0,02% (igual a aproximadamente 7,2 mg/kg/dia de anilina em machos). Isso, junto com estudos que avaliam o padrão de acumulação de radiomarcador ligado derivado da anilina no baço (Ref. 37), apoia a conclusão de que existe um limiar para a carcinogenicidade da anilina (Ref. 36). O peso da evidência apoia a conclusão de que esses tumores não resultam de um modo de ação mutagênico primário (Ref. 38).

Limites regulatórios e/ ou publicados

A EPA dos EUA (Ref. 39) descreve uma avaliação quantitativa do risco de câncer para anilina com base no estudo do CIIT (Ref. 26) e no uso de um multiestágio linearizado. A curva de inclinação da potência do câncer resultante foi de 0,0057/mg/kg/dia e a dose associada a um risco de câncer de 1 em 100.000 ao longo da vida é calculada como sendo de 120 µg/dia. No entanto, a avaliação afirma que esse procedimento pode não ser o método mais apropriado para a derivação do fator de inclinação, pois o acúmulo de anilina no baço é não linear (Ref. 39). Observa-se um acúmulo mínimo de anilina e nenhuma hemossiderose em doses abaixo de 10 mg/kg e, como já descrito, a hemossiderose pode ser importante na indução dos tumores esplênicos observados em ratos.

Exposição diária permitida (EDP)

Considera-se inadequado basear uma AI para anilina na extrapolação linear para tumores do baço observados em ratos, uma vez que estes têm uma resposta não linear à dose, a anilina não é mutagênica e a genotoxicidade não é central no modo de ação da carcinogenicidade induzida pela anilina. A EDP é derivada usando o processo definido no guia Q3C do ICH (Ref. 40).

Fundamentação da seleção do estudo para o cálculo da EDP

Os dados do estudo de carcinogenicidade de 2 anos em ratos, conduzido pelo CIIT (Ref. 26), foram utilizados. Os níveis de dose de 200, 600 e 2000 ppm para cloridrato de anilina na dieta foram equivalentes aos níveis de dose de anilina de 7,2, 22 e 72 mg/kg/dia. Tumores foram observados em machos com doses elevadas e um sarcoma estromal do baço foi identificado em 22 mg/kg/dia. Com base nesses dados, a dose mais baixa de 7,2 mg/kg/dia foi usada para definir o nível de efeito não observado para tumores (NOEL).

O cálculo da EDP é: $(\text{NOEL} \times \text{ajuste de peso corporal (kg)}) / F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5$

Os seguintes fatores de segurança descritos no guia Q3C do ICH foram aplicados para determinar a EDP da anilina:

F1 = 5 (rato para humano)

F2 = 10 (variabilidade interindividual)

F3 = 1 (duração do estudo pelo menos de meia vida)

F4 = 10 (toxicidade grave – carcinogenicidade não genotóxica)

F5 = 1 (usando um NOEL)

EDP vitalícia = 7,2 mg/kg/dia x 50 kg/(5 x 10 x 1 x 10 x 1)

EDP vitalícia = 720 µg/dia

Referências

1. Chung KT, Murdock CA, Zhou Y, Stevens SE, Li YS, Wei CI, *et al.* Effects of the nitro- grupo on the mutagenicity and toxicity of some benzamines. *Environ Mol Mutagen* 1996;27:67-74.
2. IARC. Some aromatic amines, anthraquinones and nitroso compounds, and inorganic fluorides used in água potável and dental preparations. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1982; 27:39.
3. IARC. Genetic and related effects: An update of selected IARC Monographs from volumes 1 to 42. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon.1987. Addendum 6: 68.
4. IARC. Overall evaluation of carcinogenicity: An update of IARC monographs volumes 1 to 42. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1987. Addendum 7: pp 99 and 362.
5. Jackson MA, Stack HF, Waters MD. The genetic toxicology of putative nongenotoxic carcinogens. *Mutat Res* 1993;296:241-77.
6. Brams A, Buchet JP, Crutzen-Fayt MC, De Meester C, Lauwerys R, Leonard A. A Comparative Study, With 40 Chemicals, of The Efficiency of ohe *Salmonella* Assay and the SOS Chromotest (Kit Procedure). *Toxicol Lett* 1987;38:123-33.
7. Rashid KA, Arjmand M, Sandermann H, Mumma RO. Mutagenicity of chloroaniline/lignin metabolites in the *Salmonella*/microsome assay. *J Environ Sci Health* 1987;Part B B22(6):721-9.
8. Gentile JM, Gentile GJ and Plewa M. Mutagenicity of selected aniline derivatives to *Salmonella* following plant activation and mammalian hepatic activation. *Mutat Res* 1987;188:185-96.
9. Wangenheim J, Bolcsfoldi G. Camundongo lymphoma L5178Y thymidine kinase locus assay of 50 compounds; *Mutagenesis* 1988;3(3):193-205.
10. Amacher DE, Paillet SC, Turner GN, Ray VA, Salsburg DS. Point mutations at the thymidine kinase locus in L5178Y camundongo lymphoma cells. *Mutat Res* 1980;72:447-74.

11. McGregor DB, Brown AG, Howgate S, McBride D, Riach C, Caspary WJ. Responses of the L5178y camundongo lymphoma cell forward mutation assay. V: 27 Coded Chemicals. Environ Mol Mutagen 1991;17:196-219.
12. Abe S, Sasaki M. Chromosome aberrations and sister chromatic exchanges in Chinese hamster cells exposed to various chemicals. J Natl Cancer Inst 1977;58:1635-41.
13. Ishidate M, Jr, Odashima S. Chromosome tests with 134 compounds on Chinese hamster cells *in vitro* – A screening for chemical carcinogens. Mutat Res 1977;48:337-54.
14. Ishidate M Jr. The data book of chromosomal aberration tests *in vitro* on 587 chemical substances using Chinese hamster fibroblast cell line (CHL cells). Tokyo . The Realize Inc. 1983;p26.
15. Galloway SM, Armstrong MJ, Reuben C, Colman S, Brown B, Cannon C, *et al.* Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese Hamster Ovary cells: Evaluations Of 108 Chemicals. Environ Mol Mutagen 1987;10 Suppl 10:1-175.
16. Jones E, Fox V. Lack of clastogenicity activity of aniline in the camundongo bone marrow. Mutagenesis 2003;18:283-6.
17. Bomhard EM. High-dose clastogenic activity of aniline in the rat bone marrow and its relationship to the carcinogenicity in the spleen of ratos. Arch Toxicol 2003;77:291-7.
18. Westmoreland C, Gatehouse DG. Effects of aniline hydrochloride in the camundongo bone marrow micronucleus test after oral administration. Carcinogenesis 1991;12:1057-9.
19. Ashby J, Vlachos DA, Tinwell H. Activity of aniline in the camundongo bone marrow micronucleus assay. Mutat Res 1991;263:115-7.
20. Sicardi SM, Martiarena JL, Iglesias MT. Mutagenic and analgesic activities of aniline derivatives. J Pharm Sci 1991;80:761-4.
21. Ress NB, Witt KL, Xu J, Haseman JK, Bucher JR. Micronucleus induction in camundongo exposed to diazoaminobenzene or its metabolites, benzene and aniline: implications for diazoaminobenzene carcinogenicity. Mutat Res 2002;521:201-8.
22. George E, Andrews M, and Westmoreland C. Effects of azobenzene and aniline in the rodent bone marrow micronucleus test. Carcinogenesis 1990;11:1551-5.
23. Witt KL, Knapton A, Wehr CM, Hook GJ, Mirsalis J, Shelby MD *et al.* Micronucleated erythrocyte frequency in peripheral blood of B6C3F1 camundongo from short-term, prechronic and chronic studies of the NTP carcinogenesis bioassay program. Environ Mol Mutagen 2000;36:163–94.
24. Parodi S, Pala M, Russo P, Zunino A, Balbi C, Albini A, *et al.* DNA damage in liver, kidney, bone marrow, and spleen of ratos and camundongo treated with commercial and purified aniline as determined by alkaline elution assay and sister chromatid exchange induction. Cancer Res 1982;42:2277-83.

25. Parodi S, Zunino A, Ottaggio L, De Ferrari M, Santi L. Lack of correlation between the capability of inducing sister chromatid exchanges *in vivo* and carcinogenic potency for 16 aromatic amines and azo derivatives. *Mutat Res* 1983;108:225-38.
26. CIIT. 1982. 104-week chronic toxicity study in rats with aniline hydrochloride. Final report. Report prepared for CIIT by Hazleton Laboratories America, Inc. CIIT Docket No. 11642. CIIT, Research Triangle Park, NC.
27. NCI (National Cancer Institute) National Toxicology Program. Technical report on the bio-assay for Aniline hydrochloride for possible carcinogenicity. (CAS No., 142-04-1). NCI-CG-TR-130. 1978. Available from: URL: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr130.pdf
28. Hagiwara A, Arai M, Hirose M, Nakanowatari J-I, Tsuda H and Ito N. Chronic effects of norharman in rats treated with aniline. *Toxicol Lett* 1980;6:71-5.
29. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
30. Steinheider G, Neth R, Marguardt H. Evaluation of nongenotoxic and genotoxic factors modulating the frequency of micronucleated erythrocytes in the peripheral blood of camundongo. *Cell Biol Toxicol* 1985;1:197-211.
31. Tweats D, Blakey D, Heflich RH, Jacobs A, Jacobsen SD, Nohmi TT, *et al.* Report of the IWGT working grupo on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. *Mutat Res* 2007;627:78-91.
32. Khan MF, Wu X, Boor PJ, Ansari GAS. Oxidative modification of lipids and proteins in aniline induced splenic toxicity. *Toxicol Sci* 1999;48:134-40.
33. Khan MF, Wu X, Wang JL. Upregulation of transforming growth factor-beta 1 in the spleen of aniline-induced rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003;187:22-8.
34. Weinberger MA, Albert RH, Montgomery SB. Splenotoxicity associated with splenic sarcomas in rats fed high doses of D & C Red No. 9 or aniline hydrochloride. *J Natl Cancer Inst* 1985; 5:681-7.
35. Smith RP, Alkaitis AA, Shafer PR. Chemically induced methemoglobinemias in the camundongo. *Biochem. Pharmacol* 1967;16:317-28.
36. Bus JS, Popp JA. Perspectives on the mechanism of action of the splenic toxicity of aniline and structurally-related compounds. *Food Chem Toxicol* 1987;25:619-26.
37. Robertson O, Cox MG, Bus JS. Response of the erythrocyte and spleen to aniline insult in Fischer 344 rats. *Toxicologist* 1983;3:128.
38. Bomhard EM, Herbold BA. Genotoxic activities of aniline and its metabolites and their relationship to the carcinogenicity of aniline in the spleen of rats. *Crit Rev Toxicol* 2005;35:783-835.

39. US Environmental Protection Agency. Aniline (CAS No 62-53-3). Integrated Risk Information System (IRIS). [Online]. 1988. Available from: URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0350_summary.pdf
40. International Conference on Harmonisation (2011). Q3C(R5): Impurities: Guideline for Residual Solvents.

Cloreto de benzila (α -clorotolueno, N° CAS 100-44-7)

Potencial de exposição humana

A exposição humana é principalmente ocupacional por inalação, enquanto menos frequente é a exposição pelo consumo de água subterrânea contaminada.

Mutagenicidade/ genotoxicidade

O cloreto de benzila é mutagênico e genotóxico *in vitro*, mas não em sistemas de mamíferos *in vivo*.

A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer [*International Agency for Research on Cancer*] (IARC) publicou uma monografia realizando uma revisão completa dos dados de mutagenicidade/genotoxicidade do cloreto de benzila (Ref. 1). Algumas das principais conclusões estão resumidas aqui.

O cloreto de benzila é mutagênico em:

Ensaio de mutação microbiana reversa (Ames) na linhagem TA100 de *Salmonella typhimurium*. Os resultados do teste padrão são inconsistentes entre laboratórios e dentro dos laboratórios, mas aumentos claros são obtidos ao testar na fase gasosa (Ref. 2);

Células de hamster chinês (referência. 1).

O cloreto de benzila não induziu micronúcleos *in vivo* na medula óssea de camundongos após administração oral, intraperitoneal ou subcutânea, mas formou adutos de DNA em camundongos após a administração i.v. (Ref. 1).

Carcinogenicidade

O cloreto de benzila é classificado como Grupo 2A, provavelmente carcinogênico para humanos (Ref. 3).

O cloreto de benzila foi administrado em óleo de milho por gavagem 3 vezes/semana durante 104 semanas a ratos F-344 e camundongos B6C3F1 (Ref. 4). Os ratos receberam doses de 0, 15 ou 30 mg/kg (dose diária estimada: 0, 6,4, 12,85 mg/kg); os camundongos receberam doses de 0, 50 ou 100 mg/kg (dose diária estimada: 0, 21,4, 42,85 mg/kg). Em ratos, o único aumento estatisticamente significativo na incidência de tumores foi no adenoma/ carcinoma de células C da tireoide no grupo de doses elevadas de fêmeas (27% versus 8% no controle). Uma discussão sobre se esses tumores da tireoide estavam relacionados ao tratamento está incluída a seguir. Foram realizados vários estudos de toxicidade, mas a hiperplasia das células C foi observada apenas nesse estudo ao longo da vida e apenas em ratos fêmeas.

Em camundongos (Ref. 4), houve aumentos estatisticamente significativos na incidência de papilomas e carcinomas de pré-estômago (principalmente papilomas) na dose elevada em machos e fêmeas (62% e 37%, respectivamente, em comparação com 0% nos controles). Hiperplasia epitelial foi observada no estômago de animais sem tumores. Houve também aumentos estatisticamente significativos em camundongos machos, mas não fêmeas, no hemangioma ou hemangiossarcoma (10% versus 0% nos controles) na dose elevada e no carcinoma ou adenoma no fígado, mas apenas na dose baixa (54% versus 33% nos controles). Nos camundongos fêmeas, mas não nos machos, houve aumentos significativos na incidência de adenoma ou carcinoma alveolar-bronquiolar na dose elevada (12% versus 1,9% nos controles).

Estudos adicionais para avaliar o potencial carcinogênico foram conduzidos, mas não foram considerados de desenho de estudo adequado para uso no cálculo de AI. Em um dos três estudos tópicos (Ref. 5), os carcinomas cutâneos foram aumentados, embora não de forma significativa

estatisticamente (15% versus 0% nos controles de benzeno). Os estudos de promoção de iniciação para determinar o potencial do cloreto de benzila para iniciar o câncer de pele, usando o óleo de cróton e o éster de forbol TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato) como promotores (Ref. 6, 7, 8) foram de duração limitada e os relatórios publicados foram apresentados como achados preliminares, mas nenhum resultado final foi encontrado na literatura. Os sarcomas no local da injeção foram observados após administração subcutânea (Ref. 9).

Cloreto de benzilo – Detalhes dos estudos de carcinogenicidade

Estudo	Grupo de dose/Animais	Duração/Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/sexo mais sensível do tumor	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 4*	52/sexo/grupo Rato F344	2 anos 3 vezes/semana Gavagem	52	2: 15 e 30 mg/kg (6 e 12 mg/kg/d)	Neoplasia de células C da tireoide/ Fêmea	40,6
Ref. 4	52/sexo/grupo Camundongo B6C3F1	2 anos 3 vezes/semana Gavagem	52	2: 50 e 100 mg/kg (21 e 42 mg/kg/d)	Papiloma, carcinoma de pré-estômago/ Macho	49,6
Ref. 5	11/grupo Camundongo ICR fêmea	9,8 meses 3 vezes/semana por 4 semanas, 2 vezes/semana Dérmica	Sim (tratado com benzeno)	1: 10 µL	Sem tumores na pele	NC ^
Ref. 5	20/grupo Camundongo ICR fêmea	50 semanas 2 vezes/semana Dérmica	20 (tratado com benzeno)	1: 2.3 µL	Carcinoma de células escamosas da pele	NC ^
Ref. 6	20/grupo camundongo ICI Swiss albino macho	> 7 meses 2 vezes/semana Dérmica, em tolueno	20	1: 100 µg/camundongo	Sem tumores na pele	NC ^
Ref. 9	14 (40 mg/kg), e 8 (80 mg/kg) Rato BD	51 semanas 1 vez/semana Subcutâneo	Sim	2: 40 e 80 mg/kg/semana	Sarcoma no local da injeção	NC ^
Ref. 7	40/sexo/grupo camundongo Original Theiler	10 meses 1 dose (em tolueno); aguarde 1 semana Promotor (óleo de cróton) 2 vezes/semana	40	1: 1 mg/camundongo	Sem tumores na pele	NC ^

Estudo	Grupo de dose/Animais	Duração/Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/sexo mais sensível do tumor	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 8	Camundongos Sencar	6 meses 1 dose; Promotor (TPA) 2 vezes/semana	Sim	3: 10; 100 e 1000 µg/ camundongo	20% de tumores de pele [5% nos controles de TPA] (os controles de DMBA tiveram tumores de pele em 11 semanas)	NC ^

Os estudos listados estão no CPDB (Ref. 10), salvo indicação em contrário.

* Estudo de carcinogenicidade selecionado para o cálculo da AI.

^ NC = Não calculado; tamanho pequeno de grupo, duração limitada. Não incluído no CPDB, pois a via com maior probabilidade de exposição sistêmica é considerada mais relevante.

Modo de ação para carcinogenicidade

Os tipos de tumores com o TD₅₀ mais baixo calculado (potência mais elevada) no CPDB (Ref. 10) para cloreto de benzila são tumores de pré-estômago em camundongos e tumores de células C da tireoide em ratos fêmeas. A relevância dos tumores de pré-estômago na avaliação de risco humano para doses baixas e não irritantes, como as associadas a uma potencial impureza, é altamente questionável.

Os tumores de pré-estômago em roedores têm sido objeto de muita discussão na avaliação de risco para seres humanos. Com produtos químicos não mutagênicos, é reconhecido que após a administração por gavagem oral, a inflamação e a irritação relacionadas a elevadas concentrações de materiais de teste em contato com o pré-estômago podem levar à hiperplasia e, finalmente, a tumores. O material introduzido por gavagem pode permanecer por algum tempo no pré-estômago de roedores antes da descarga no estômago glandular, em contraste com a rápida passagem pelo esôfago humano. Essa indução tumoral não é relevante para os seres humanos em doses não irritantes. Os mesmos efeitos inflamatórios e hiperplásicos também são vistos com produtos químicos mutagênicos, onde é mais complexo determinar a contribuição relativa ao modo de ação desses efeitos não mutagênicos e de doses elevadas, em comparação com a indução direta de mutação. No entanto, muitas vezes é possível argumentar com firmeza a tumorigênese no local de contato que é relevante apenas em concentrações que causam irritação/ inflamação, potencialmente com mecanismos secundários de dano. Espera-se que a proliferação celular desempenhe um papel importante no desenvolvimento do tumor, de modo que exista uma resposta não linear à dose e os tumores do pré-estômago (ou outro local de contato) não sejam relevantes para a exposição humana a dosagem baixa.

Proctor *et al.* (Ref. 11) propuseram uma abordagem sistemática para avaliar a relevância de tumores de pré-estômago na avaliação de risco de câncer, levando em consideração se alguma genotoxicidade conhecida é potencialmente relevante para os tecidos humanos (isso incluiria se um composto é genotóxico *in vivo*), se os tumores após administração oral de qualquer tipo são específicos para o pré-estômago e se os tumores são observados apenas em doses que irritam o pré-estômago ou excedem o MTD.

Como descrito acima e na tabela, o cloreto de benzila induz predominantemente tumores no local de contato em ratos e camundongos após exposição a doses elevadas por gavagem (tumores do pré-estômago), por injeção (sarcoma no local da injeção) e por aplicação tópica na pele modelo de iniciação-promoção de tumores em camundongos Sencar sensíveis. Um relatório da OCDE no Conjunto de Dados de Informações sobre Triagem [*Screening Information Dataset*] (SIDS) para produtos químicos de alto volume descreve o cloreto de benzila como intensamente irritante para a pele, olhos e mucosas em estudos de doses agudas e repetidas (Ref. 12). Grupos de 10 ratos Fischer 344 de ambos os sexos morreram dentro de 2-3 semanas por gastrite aguda e crônica grave do pré-estômago, frequentemente com úlceras, após administração oral 3 vezes/semana de doses ≥ 250 mg/kg para machos e ≥ 125 mg/kg para fêmeas (Ref. 4). As alterações proliferativas observadas em ratos fêmeas em doses mais baixas incluíram hiperplasia do pré-estômago (62 mg/kg) e hiperqueratose do pré-estômago (30 mg/kg). A incidência de tumores do pré-estômago foi alta em camundongos no estudo de carcinogenicidade, e Lijinsky *et al.* (Ref. 4) também observaram lesões não neoplásicas no pré-estômago do rato no estudo de detecção subcrônica, mas poucas neoplasias do pré-estômago se desenvolveram no estudo de carcinogenicidade em ratos. Devido à inclinação da curva resposta à dose e à dificuldade em estabelecer o MTD para ratos, o autor especula que era possível que a dose usada no estudo em ratos fosse marginalmente baixa demais para induzir um efeito carcinogênico significativo em ratos.

No caso do cloreto de benzila, outros tipos de tumores foram discutidos como possivelmente relacionados ao tratamento, além daqueles no local de contato. No bioensaio oral em camundongos, Lijinsky caracterizou os efeitos carcinogênicos que não os tumores de pré-estômago como "marginais", compreendendo um aumento de neoplasias endoteliais em machos, neoplasias alvéolo-bronquiolares dos pulmões apenas em camundongos fêmeas (nenhuma delas é estatisticamente significativa) e neoplasias hepatocelulares apenas em camundongos machos com doses baixas (esse tipo de tumor foi descontado como não relacionado à dose). É preciso observar que o SIDS da OCDE (Ref. 12) relata observações de hiperplasia hepática grave a moderada relacionada à dose em um estudo de toxicidade oral de 26 semanas em camundongos.

Aumentos estatisticamente significativos foram relatados nos hemangiomas/ hemangiossarcomas do sistema circulatório nos camundongos machos (TD₅₀ 454 mg/kg/dia) e nos adenomas ou carcinomas de células C da tireoide nos ratos fêmeas (TD₅₀ 40,6 mg/kg/dia). Os níveis de tumores de células C da tireoide em ratos fêmeas no grupo de doses elevadas, embora maiores que os controles simultâneos de fêmeas (14/52 versus 4/52 nos controles), foram semelhantes aos níveis nos controles simultâneos de machos (12/52). Nos machos, os níveis de tumor nas células C da tireoide foram menores nos ratos tratados do que nos ratos controle. Em uma compilação de dados históricos de controle de ratos Fisher 344 nos estudos NTP (Ref. 13, 14), machos e fêmeas mostram níveis comparáveis de adenomas de células C mais carcinomas nessa linhagem de ratos, embora a faixa seja maior nos machos. Portanto, é provavelmente justificável comparar os níveis de tumor da tireoide em ratos fêmeas tratadas com cloreto de benzila com os controles simultâneos de ambos os sexos e questionar se os tumores da tireoide em fêmeas estão relacionados ao tratamento, embora tenham sido superiores ao intervalo de controle histórico citado na época (10%).

Limites regulatórios e/ ou publicados

A EPA dos EUA (Ref. 15) derivou um fator de inclinação oral de $1,7 \times 10^{-1}$ por (mg/kg)/dia, o que corresponde a um nível de risco de 1 em 100.000 de 2 µg/L ou aproximadamente 4 µg/dia usando as premissas da EPA.

Ingestão aceitável (AI)

Fundamentação da seleção do estudo para o cálculo da AI

A avaliação mais robusta do potencial carcinogênico do cloreto de benzila foi o estudo de Lijinsky *et al.* (Ref. 4), que utilizou administração oral (gavagem). Nesse estudo, os animais foram tratados 3 dias por semana, em vez de 5 dias por semana, como em um estudo típico do NCI/NTP. No geral, no entanto, o estudo em ratos é considerado adequado para o cálculo de uma AI porque havia evidências de que a dose superior estava próxima da dose máxima tolerada. Em um estudo de 26 semanas descrito no mesmo relatório (Ref. 4), todos os dez ratos de cada sexo que receberam 125 ou 250 mg/kg (3 dias por semana) morreram dentro de 2-3 semanas. A causa da morte foi gastrite grave e úlceras no pré-estômago; em muitos casos, também houve necrose miocárdica. A 62 mg/kg, apenas 4 de 26 fêmeas sobreviveram até 26 semanas, e foram observadas necrose miocárdica e hiperplasia do pré-estômago; hiperqueratose do pré-estômago foi observada em algumas fêmeas com dose de 30 mg/kg. A 62 mg/kg de cloreto de benzila, houve uma diminuição no ganho de peso corporal em ambos os sexos, o que foi estatisticamente significativo nos machos. Assim, a dose elevada escolhida para o estudo de carcinogenicidade foi de 30 mg/kg (3 vezes por semana). Nessa dose, não houve diferença dos controles na sobrevivência no estudo de carcinogenicidade de dois anos, mas três ratos machos apresentaram carcinomas de células escamosas e papilomas do pré-estômago, portanto, é improvável que um estudo ao longo da vida possa ter sido realizado com uma dose mais elevada.

Como descrito na Seção Métodos 2.2, a extrapolação linear do TD₅₀ foi usada para derivar a AI. Como descrito acima, é altamente improvável que o cloreto de benzila represente um risco de tumores no local de contato em humanos expostos a baixas concentrações como impurezas em produtos farmacêuticos, bem abaixo das concentrações que podem causar irritação/ inflamação. Portanto, os tumores de pré-estômago observados em camundongos machos não são considerados relevantes para o cálculo da AI. A importância dos tumores de células C da tireoide em ratos fêmeas também é questionável, uma vez que esses tumores ocorrem comumente em ratos controle. No entanto, dada a origem incerta desses tumores, os tumores de células C da tireoide foram utilizados para derivar a AI, uma vez que estavam associados ao menor TD₅₀: 40,6 mg/kg/dia.

Cálculo de AI

$$\text{AI vitalícia} = \text{TD}_{50}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 40,6 \text{ (mg/kg/dia)}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 40,6 \text{ }\mu\text{g/dia (41 }\mu\text{g/dia)}$$

Referências

1. IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. [Online] 1972-PRESENT. (Multivolume work). 1999. Available from: URL: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol71/mono71-19.pdf>
2. Fall M, Haddouk H, Morin JP, Forster R. Mutagenicity of benzyl chloride in the *Salmonella*/microsome mutagenesis assay depends on exposure conditions. *Mutat Res* 2007;633:13-20.
3. IARC. An update of selected IARC Monographs from volumes 1 to 42. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon.1987. Suppl. 7: 126-7; 148-9.

4. Lijinsky W. Chronic Bioassay of Benzyl Chloride in Rato F344s and (C57BL/6J X BALB/c) F1 Mice. *J Natl Cancer Inst* 1986;76:1231-6.
5. Fukuda K, Matsushita H, Sakabe H, Takemoto K. Carcinogenicity of benzyl chloride, benzal chloride, benzotrichloride and benzoyl chloride in mice by skin application. *Gann* 1981;72(5):655-64.
6. Ashby J, Gaunt C, Robinson M. Carcinogenicity bioassay of 4-chloromethylbiphenyl (4CMB), 4-hydroxymethylbiphenyl (4HMB) and benzyl chloride (BC) on camundongo skin: Interim (7 month) report. *Mutat Res* 1982;100:399-401.
7. Coombs MM. Attempts to initiate skin tumors in mice in the 2-stage system using 4-chloromethylbiphenyl (4CMB), -hydroxymethylbiphenyl (4HMB) and benzyl chloride (BC), Report of the experiment at 10 months. *Mutat Res* 1982;100:403-5.
8. Coombs MM. The UKEMS Genotoxicity Trial: A summary of the assays for skin tumour induction in mice, the subcutaneous implant test and the sebaceous gland suppression test. *Mutat Res* 1982;100:407-9.
9. Druckrey H, Kruse H, Preussmann R, Ivankovic S, Landschuetz C. Cancerogenic alkylating substances. III. Alkyl-halogenides, - sulfates, - sulfonates and strained heterocyclic compounds. 1970;74(3):241-73.
10. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
11. Proctor DM, Gatto NM, Hong SJ, Allamneni KP. Mode-of-action framework for evaluation of the relevance of rodent pré-estômago tumors in cancer risk assessment. *Toxicol Sci* 2007;98:313-26.
12. OECD Chemicals Screening Information Dataset (SIDS) for high volume chemicals benzyl chloride report published by the United Nations Environmental Programme (UNEP). [Online]. Available from: URL:<http://www.chem.unep.ch/irptc/sids/OECDSIDS/100447.pdf>
13. Haseman JK, Huff J, Boorman GA. Use of historical control data in carcinogenicity studies in rodents., *Toxicol Pathol* 1984;12:126-35.
14. Haseman JK, Hailey JR, Morris RW. Spontaneous neoplasm incidence in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice in two-year carcinogenicity studies: A National Toxicology Program update, *Toxicol Pathol* 1998;26:428-41.
15. US Environmental Protection Agency. Benzyl chloride (CAS 100-44-7). Integrated Risk Information System (IRIS). [Online] 1989. Available from: URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0393_summary.pdf

Éter bis (clorometílico) (BCME, N° CAS 542-88-1)

Potencial de exposição humana

Uso industrial, principalmente por inalação com exposição ambiental mínima como resultado da rápida degradação do ambiente, apoiada pela ausência relatada de BCME no ar ou na água ambiente (Ref. 1).

Mutagenicidade/ genotoxicidade

O BCME é mutagênico e genotóxico *in vitro* e *in vivo*.

O BCME é mutagênico em:

Ensaio de mutação microbiana reversa (Ames), *Salmonella typhimurium* (Ref. 2).

In vivo, o BCME não causou aberrações cromossômicas nas células da medula óssea de ratos expostos por inalação por seis meses (Ref. 3). Um ligeiro aumento na incidência de aberrações cromossômicas foi observado nos linfócitos periféricos dos trabalhadores expostos ao BCME (Ref. 4).

Carcinogenicidade

O BCME é classificado pela EPA dos EUA como uma substância carcinogênica humana conhecida do Grupo A, (Ref. 5), e pela IARC como um composto do Grupo 1, carcinogênico para humanos (Ref. 6).

Conforme descrito nas revisões acima, vários estudos epidemiológicos demonstraram que trabalhadores expostos ao BCME (por inalação) têm um risco aumentado de câncer de pulmão. Após a exposição por inalação, o BCME é carcinogênico para o trato respiratório de ratos e camundongos, conforme descrito nos seguintes estudos:

O estudo de Leong *et al.* (Ref. 3) foi selecionado para derivação da AI com base no desenho do estudo mais robusto e no menor valor de TD₅₀. Grupos de ratos Sprague-Dawley e camundongos Ha/ICR machos foram expostos por inalação a 1, 10 e 100 ppb de BCME durante 6h/dia, 5 dias/semana por 6 meses e subsequentemente observados pela duração de sua vida útil natural (cerca de 2 anos). A avaliação de grupos de ratos sacrificados no final do período de exposição de 6 meses não revelou anormalidades na hematologia, citologia esfoliativa das lavagens pulmonares ou parâmetros citogenéticos das células da medula óssea. No entanto, 86,5% dos ratos sobreviventes que foram expostos a 100 ppb (7780 ng/kg/dia ou ~8 µg/kg/dia) de BCME desenvolveram subsequentemente tumores nasais (esteseoneuroepiteliomas, tumores do epitélio olfativo, que são semelhantes ao neuroblastoma humano raro) e aproximadamente 4% dos ratos desenvolveram adenomas pulmonares. Não foram observados tumores em ratos expostos a 10 ou 1 ppb de BCME. Os camundongos expostos a 100 ppb de BCME não desenvolveram tumores nasais, mas mostraram um aumento significativo na incidência de adenomas pulmonares em relação aos ratos de controle. Os camundongos expostos a 10 ou 1 ppb de BCME não mostraram um aumento significativo na incidência de adenomas pulmonares.

Em um estudo de inalação, ratos Sprague-Dawley machos foram expostos ao BCME em um nível de dose única de 0,1 ppm (100 ppb) 6 h/dia, 5 dias/semana por 10, 20, 40, 60, 80 ou 100 dias, e então observados para o restante de suas vidas (Ref 7). Houve um aumento acentuado na incidência de vários tipos de tumores do trato respiratório nos animais tratados em comparação com os controles.

O BCME é um agente carcinogênico no local de contato, produzindo sarcomas no local da injeção (Ref. 8) e tumores de pele em camundongos (Ref. 9); também induz adenomas pulmonares em camundongos recém-nascidos após aplicação subcutânea (Ref. 10).

Éter bis (clorometílico) (BCME) – Detalhes dos estudos de carcinogenicidade

Estudo	Grupo de dose/Animais	Duração/Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/sexo mais sensível do tumor	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 3*	~104/grupo Rato macho Sprague-Dawley.	28 semanas 6 h/d, 5 d/semana Inalação	104	3: 1; 10; 100 ppb (53;528; 7780 ng/ kg/d)	Estesioneuroepiteliomas da passagem nasal	0,00357
Ref. 3	138-144/ Grupo Camundongo, macho ICR/Ha.	25 semanas 6 h/d, 5 d/semana Inalação	157	3: 1; 10; 100 ppb (0,295; 2,95;33,6 ng/kg/d)	Adenomas pulmonares	Sem aumentos significativos
Ref. 7	30-50 tratados por diferentes durações com a mesma concentração, ratos Sprague Dawley machos.	6h/d, 5d/semana, Para 10, 20, 40, 60, 80 e 100 exposições. Inalação	240	1: 0,1 ppm	Câncer de pulmão e nasal	NC [^]
Ref. 7	100/grupo Hamsters machos Golden Syrian.	Vitalício 6h/d, 5d/semana, Inalação	NA	1: 1 ppm	Um indiferenciado no pulmão	NC [^]
Ref. 9	50/grupo camundongos ICR/Ha Swiss fêmeas.	424-456 dias, uma vez por semana Intraperitoneal	50	1: 0,114 mg/kg/d	Sarcoma (no local da injeção)	0,182

Os estudos listados estão no CPDB (Ref. 11), salvo indicação contrária.

* Estudo de carcinogenicidade selecionado para o cálculo da AI

[^] NC = Não calculado devido ao desenho de carcinogenicidade não padrão. Não está no CPDB.

NA = Não disponível, pois os controles não foram relatados no estudo

Modo de ação para carcinogenicidade

O BCME é um carcinógeno mutagênico e a ingestão aceitável é calculada por extrapolação linear do TD₅₀.

Limites regulatórios e/ ou publicados

A EPA dos EUA (Ref. 5) calculou um fator de inclinação do câncer oral de 220 por mg/kg/dia com base na modelagem linearizada de vários estágios dos dados do estudo de inalação por Kuschner *et al.* (Ref. 7). A dose inalada (e oral) associada a um risco de câncer de 1 em 100.000 ao longo da vida é de 3,2 ng/dia (1,6 x 10⁻⁸ mg/m³ para inalação, 1,6 x 10⁻⁶ mg/L para exposição oral).

Ingestão aceitável (AI)

Fundamentação da seleção do estudo para o cálculo da AI

O BCME é um agente mutagênico *in vitro*, causa câncer em animais e humanos e é classificado como um carcinógeno humano conhecido. Não foram realizados estudos de carcinogenicidade oral, de modo que os estudos de injeção intraperitoneal e inalação são considerados como base para a definição da AI. O desfecho mais sensível foi o aumento de tumores nasais (esteseoneuroepiteliomas) em ratos machos no estudo de carcinogenicidade por inalação (Ref. 3), com um TD₅₀ de 3,57 μg/kg/dia. A AI derivada por extrapolação linear desse TD₅₀, ~4ng/dia, é essencialmente a mesma que a recomendação de 3,2 ng/dia da EPA dos EUA. O estudo (Ref. 3) teve um desenho confiável com vários níveis de dose e > 50 animais por grupo de dose.

Faltam evidências de tumores em outros locais além daqueles expostos por inalação; o estudo citado acima (Ref. 10) que descreve tumores de pulmão em camundongos recém-nascidos após a aplicação na pele pode não ser definitivo se a inalação puder ter ocorrido como resultado da aplicação na pele. No entanto, a AI derivada aqui a partir de dados de inalação é considerada aplicável a outras vias, porque é altamente conservadora (ordens de magnitude abaixo do TTC padrão de 1,5 μg/dia). A AI também é semelhante ao limite derivado pela EPA dos EUA (com base nos dados de inalação), recomendado tanto para inalação quanto para ingestão (água potável) de BCME (4 ng/dia vs 3,2 ng/dia).

Cálculo de AI

$$\text{AI vitalícia} = \text{TD}_{50}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 3,57 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}/50.000 \times 50$$

$$\text{AI vitalícia} = \mathbf{0,004 \mu\text{g}/\text{dia} \text{ ou } 4 \text{ ng}/\text{dia}}$$

Referências

1. NIH ROC. National Institutes of Health. Report on Carcinogens, Twelfth Edition [Online]. 2011. Available from: URL: [http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/bis\(chloromethyl\)ether.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/profiles/bis(chloromethyl)ether.pdf)
2. Nelson N. The chloroethers - occupational carcinogens: A summary of laboratory and epidemiology studies. Ann. NY Acad Sci 1976;271:81-90.
3. Leong BKJ, Kociba RI, Jersey GC. A lifetime study of rats and mice exposed to vapors of bis(chloromethyl) ether. Toxicol Appl Pharmacol 1981;58:269-81.
4. IARC. Bis(chloromethyl)ether and chloromethyl methyl ether (technical-grade). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans.

International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Lyon. 1987;Addendum 7: 131-3.

5. US Environmental Protection Agency. Bis(chloromethyl)ether (CAS# 542-88-1). Integrated Risk Information System (IRIS). [Online]. 1999. Available from: URL: <http://www.epa.gov/iris/subst/0375.htm>
6. IARC. Chemicals, industrial processes and industries associated with cancer in humans. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1982; Volumes 1 to 29, Addendum 4.
7. Kuschner M, Laskin S, Drew RT, Cappiello V, Nelson N. Inhalation carcinogenicity of alpha halo ethers. III. Lifetime and limited period inhalation studies with bis(chloromethyl)ether at 0.1 ppm. *Arch Environ Health* 1975;30:73-7.
8. Van Duuren BL, Sivak A, Goldschmidt BM, Katz C, Melchionne S. Carcinogenicity of haloethers. *J Nat Cancer Inst* 1969; 43: 481-6.
9. Van Duuren BL, Goldschmidt BM, Seidman I. Carcinogenic activity of di- and trifunctional α -chloro ethers and of 1,4-dichlorobutene-2 in ICR/HA swiss mice. *Cancer Res* 1975;35:2553-7.
10. Gargus JL, Reese WH Jr., Rutter, HA. 1969. Induction of lung adenomas in newborn mice by bis(chloromethyl)ether. *Toxicol Appl Pharmacol* 1969;15:92-96.
11. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>

***p*-cloroanilina (Nº CAS 106-47-8) e**

HCl de *p*-cloroanilina (Nº CAS 20265-96-7)

Potencial de exposição humana

A exposição industrial é derivada principalmente das indústrias de corante, têxtil, borracha e outras (Ref. 1). Se liberado no meio ambiente, é inerentemente biodegradável na água em condições aeróbicas (Ref. 2).

Mutagenicidade/ Genotoxicidade

A *p*-cloroanilina é mutagênica *in vitro*, com evidências limitadas de genotoxicidade *in vivo*.

Uma revisão detalhada dos testes de genotoxicidade em uma variedade de sistemas é fornecida pela OMS (Ref. 3) com referências; portanto, apenas as principais conclusões são resumidas aqui.

A *p*-cloroanilina é mutagênica em:

Ensaio de mutação microbiana reversa (Ames); o aumento de 2 a 3 vezes nos revertentes foi observado em alguns laboratórios, mas não em outros.

Os resultados positivos relatados no ensaio *tk* de células L5178Y de linfoma de camundongo (Ref. 3) são pequenos aumentos, associados a citotoxicidade substancial, e não atendem aos critérios atuais para um ensaio positivo usando o "fator de avaliação global" (Ref. 4).

Pequenos aumentos nas aberrações cromossômicas em células de ovário de hamster chinês não foram consistentes entre dois laboratórios.

In vivo, um único tratamento oral não induziu micronúcleos em camundongos a 180 mg/kg, mas um aumento significativo foi relatado em 300 mg/kg/dia após 3 doses diárias em camundongos.

Carcinogenicidade

A *p*-cloroanilina é classificada pela IARC como Grupo 2B, possivelmente carcinogênica para humanos com evidência adequada de carcinogenicidade em animais e evidência inadequada em humanos (Ref. 5).

Foram realizados estudos de carcinogenicidade em animais para a *p*-cloroanilina ou seu sal cloridrato, HCl de *p*-cloroanilina.

O estudo da gavagem oral do NTP (Ref. 6) foi usado para calcular a AI, em que o HCl de *p*-cloroanilina era carcinogênico em ratos machos, com base no aumento da incidência de tumores do baço: (Incidência combinada de sarcomas: controle de veículo, 0/49; dose baixa, 1/50; dose média, 3/50; dose elevada, 38/50). A fibrose do baço, uma lesão pré-neoplásica que pode progredir para sarcomas, foi observada em ambos os sexos (Ref. 6, 7). Em ratos fêmeas, as neoplasias esplênicas foram observadas apenas em um rato com dose média e um rato com dose elevada. O aumento da incidência de feocromocitoma da glândula adrenal em ratos machos e fêmeas pode ter sido relacionado à administração de *p*-cloroanilina; feocromocitomas malignos não foram aumentados. Em camundongos machos, a incidência de hemangiossarcomas do fígado ou do baço no grupo de doses elevadas foi maior que a dos controles do veículo (4/50 em 0 mg/kg/dia; 4/49 em 2,1 mg/kg/dia; 1/50 em 7,1 mg/kg/dia; 10/50 em 21,4 mg/kg/dia). As incidências de adenomas ou carcinomas hepatocelulares (combinados) foram aumentadas em camundongos machos dosados; destes, os números de carcinomas hepatocelulares foram (3/50 em 0 mg/kg/dia; 7/49 em 2,1 mg/kg/dia; 11/50 em 7,1 mg/kg/dia; 17/50 em 21,4 mg/kg/dia). O estudo com camundongos fêmeas foi negativo. A conclusão final do NTP (Ref. 6) foi que havia evidência clara de carcinogenicidade em ratos machos,

evidência equívoca de carcinogenicidade em ratos fêmeas, alguma evidência de carcinogenicidade em camundongos machos e nenhuma evidência de carcinogenicidade em camundongos fêmeas.

Um estudo anterior utilizou *p*-cloroanilina administrada na alimentação de ratos e camundongos (Ref. 8). Neoplasias esplênicas foram encontradas em ratos machos doseados e tumores hemangiomas em camundongos. Embora as incidências desses tumores sejam fortemente sugestivas de carcinogenicidade, o NCI concluiu que não foram encontradas evidências suficientes para estabelecer a carcinogenicidade da *p*-cloroanilina em ratos ou camundongos nas condições desses estudos. Como a *p*-cloroanilina é instável nos alimentos para animais, os animais podem ter recebido o produto químico em menos do que a concentração pretendida (Ref. 3). Portanto, esse estudo é considerado inadequado.

***p*-Cloroanilina e HCl de *p*-cloroanilina – Detalhes dos estudos de carcinogenicidade**

Estudo	Grupo de dose/Animais	Duração/Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/sexo mais sensível do tumor	TD₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 6* <i>HCl de p-cloroanilina</i>	50/grupo camundongo B6C3F1 macho	103 semanas 5 vezes/ semana Gavagem	50	3: 3; 10; 30 mg/kg (2,1; 7,1; 21,4 mg/kg/d)	Adenomas or carcinomas hepatocelulares	33,8
Ref. 6 <i>HCl de p-cloroanilina</i>	50/grupo camundongo B6C3F1 fêmea	103 semanas 5 vezes/ semana Gavagem	50	3: 3; 10; 30 mg/kg (2,1; 7,1; 21,4 mg/kg/d)	Negativo	NA
Ref. 6 <i>HCl de p-cloroanilina</i>	50/grupo rato Fischer 344 macho	103 semanas 5 vezes/ semana Gavagem	50	3: 2; 6; 18 mg/kg (1,4; 4,2; 12,6 mg/kg/d)	Fibrossarcoma, haemangiossarcoma, osteossarcoma do baço	7,62
Ref. 6 <i>HCl de p-cloroanilina</i>	50/grupo rato Fischer 344 fêmea	103 semanas 5 vezes/ semana Gavagem	50	3: 2; 6; 18 mg/kg (1,4; 4,2; 12,6 mg/kg/d)	Sem aumentos significativos; equívoco	NA
Ref. 8	50/grupo rato Fischer 344 macho	78 semanas (duração do estudo: 102 sem.) Dieta	20	2: 250; 500 ppm (7,7; 15,2 mg/kg/d)	Tumores mesenquimais (fibroma, fibrossarcoma, hemangiossarcoma, osteossarcoma, sarcoma não especificado de outra forma) do baço ou cápsula esplênica	72

Estudo	Grupo de dose/Animais	Duração/Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/sexo mais sensível do tumor	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 8	50/grupo rato Fischer 344 fêmea	78 semanas (duração do estudo: 102 sem.) Dieta	20	2: 250; 500 ppm (9,6, 19 mg/kg/d)	Negativo	NA
Ref. 8	50/grupo camundongo B6C3F1 macho	78 semanas (duração do estudo: 91 sem.) Dieta	20	2: 2500; 5000 ppm (257;275 mg/kg/d)	Hemangiossarcomas (tecido subcutâneo, baço, fígado, rim). Maior incidência de todos os tumores vasculares	Não significativo (CPDB)
Ref. 8	50/grupo camundongo B6C3F1 fêmea	78 semanas (duração do estudo: 102 sem.) Dieta	20	2: 2500; 5000 ppm (278, 558 mg/kg/d)	Hemangiossarcomas (fígado e baço). Maior incidência de tumores vasculares combinados	1480

Os estudos listados estão no CPDB (Ref. 9)

* Estudo de carcinogenicidade selecionado para o cálculo da AI.

NA = Não aplicável

Modo de ação para carcinogenicidade

Tumores induzidos por *p*-cloroanilina em ratos machos, como fibrossarcomas e osteossarcomas de baço, típicos para anilina e produtos químicos relacionados. A exposição repetida à *p*-cloroanilina leva à cianose e à metahemoglobinemia, seguida de efeitos no sangue, fígado, baço e rins, manifestados como alterações nos parâmetros hematológicos, esplenomegalia e hemossiderose moderada a grave no baço, fígado e rim, acompanhados parcialmente por hematopoiese extramedular (Ref. 6, 8). Esses efeitos ocorrem secundários à hemólise excessiva induzida por compostos e são consistentes com uma anemia regenerativa (Ref. 3). A evidência apoia um mecanismo indireto para a tumorigênese, secundária a metahemoglobinemia, fibrose esplênica e hiperplasia (Ref. 10), e não a indução tumoral relacionada a uma interação direta da *p*-cloroanilina ou de seus metabólitos com o DNA. Da mesma forma, é provável que a indução relatada de micronúcleos *in vivo* seja secundária à anemia regenerativa/ eritropoiese alterada, como ocorre com a anilina (Ref. 11,12).

O tipo de tumor com o TD₅₀ mais baixo foi o de baço em ratos machos. No entanto, como esse tipo de tumor está associado a uma relação não linear de dose, os tumores do baço não foram utilizados para calcular a ingestão aceitável. Com base nos efeitos não neoplásicos (hematotóxicos), a OMS (Ref. 3) recomenda um nível de 2 µg/kg/dia, isto é, 100 µg/dia para um humano de 50 kg.

Embora os dados de mutagenicidade *in vitro* para a *p*-cloroanilina indiquem pequenos aumentos nas mutações que não são reproduzíveis nos laboratórios, um componente mutagênico para um modo de ação para tumores hepáticos não pode ser descartado.

Limites regulatórios e/ ou publicados

Não foram publicados limites regulatórios para a *p*-cloroanilina ou o sal cloridrato.

Ingestão aceitável (AI)

Como um componente mutagênico para o modo de ação dos tumores de fígado de camundongo macho não pode ser descartado, a AI foi derivada por extrapolação linear do TD₅₀ de 33,8 mg/kg/dia para números combinados de adenomas e carcinomas.

Cálculo de AI

Baseado em tumores de fígado de camundongo para HCl de *p*-cloroanilina

$$\text{AI vitalícia} = \text{TD}_{50}/50.000 \times 50\text{kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 33,8\text{mg/kg/dia}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 34 \mu\text{g/dia}$$

Referências

1. Beard RR, Noe JT. Aromatic nitro and amino compounds, Clayton GD, Clayton FE, editors. Patty's Industrial Hygiene and Toxicology. New York. John Wiley 1981; 2A:2413–89.
2. BUA. *p*-Chloroaniline. Beratergremium für Umweltrelevante Altstoffe (BUA) der Gesellschaft Deutscher Chemiker. Weinheim, VCH, 1995;171. (BUA Report 153).
3. World Health Organization (WHO). International Programme on Chemical Safety (IPCS). 2003. Concise International Chemical Assessment Document 48. 4-chloroaniline. [Online]. Available from: URL: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad48.htm>
4. Moore, MM, Honma, M, Clements J, Bolcsfoldi G, Burlinson B, Cifone M, *et al.* Camundongo Lymphoma Thymidine Kinase Gene Mutation Assay: Follow-up Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing_Aberdeen, Scotland, 2003_Assay Acceptance Criteria, Positive Controls, and Data Evaluation. Environ Mol Mutagen 2006;47:1-5.
5. IARC. Para-chloroaniline. In: Occupational exposures of hairdressers and barbers and personal use of hair colourants; some hair dyes, cosmetic colourants, industrial dyestuffs and aromatic amines. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1993;57: 305-21.
6. NTP. Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of para-chloroaniline hydrochloride (CAS No. 20265-96-7) in F344/N rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. 1989. NTP TR 351...

7. Goodman DG, Ward JM, Reichardt WD. Splenic fibrosis and sarcomas in Rato F344s fed diets containing aniline hydrochloride, *p*-Chloroaniline, azobenzene, o-toluidine hydrochloride, 4,4'-sulfonyldianiline, or D & C Red No. 9. *J Natl Cancer Inst* 1984;3:265- 73.
8. NCI. Bioassay of *p*-Chloroaniline for possible carcinogenicity, CAS No. 106-47-8. US National Cancer Institute, Bethesda, MD. 1979;NCI-CG-TR-189.
9. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
10. Bus JS, Popp JA. Perspectives on the mechanism of action of the splenic toxicity of aniline and structurally-related compounds. *Food Chem Toxicol* 1987;25:619–26.
11. Ashby J, Vlachos DA, Tinwell H. Activity of aniline in the camundongo bone marrow micronucleus assay. *Mutat Res* 1991;263:115-7.
12. Tweats D, Blakey D, Heflich RH, Jasobs A, Jacobsen SD, Nohmi TT, *et al.* Report of the IWGT working grupo on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests. I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards. *Mutat Res* 2007;627:78-91.

1-Cloro-4-nitrobenzeno (para-cloronitrobenzeno, N° CAS 100-00-5)

Potencial de exposição humana

O potencial de exposição está no uso industrial. Não há dados disponíveis para a exposição da população em geral.

Mutagenicidade/ genotoxicidade

O cloro-4-nitrobenzeno é mutagênico e genotóxico *in vitro* e *in vivo*.

O cloro-4-nitrobenzeno foi mutagênico em:

Ensaio de mutação microbiana reversa (Ames) das linhagens de *Salmonella typhimurium* TA100 e TA1535 na presença de ativação metabólica S9, e foram negativas nas TA1537, TA1538, TA98 e *E.coli* WP2uvrA (Ref. 1, 2, 3, 4). Também foi fracamente positivo sem ativação metabólica na TA1535 em 2 de 4 estudos (Ref. 4).

In vivo, as quebras de cadeia de DNA foram induzidas no fígado, rim e cérebro de camundongos suíços machos quando o cloro-4-nitrobenzeno foi administrado por via intraperitoneal (Ref. 5, 6).

Carcinogenicidade

O 1-cloro-4-nitrobenzeno é classificado pela IARC como um carcinógeno do Grupo 2, não classificável quanto à sua carcinogenicidade em seres humanos (Ref. 7) e a EPA dos EUA considera que é um carcinógeno do Grupo B2 ou provável carcinógeno humano (Ref. 8).

Foram realizados estudos de carcinogenicidade em animais com 1-cloro-4-nitrobenzeno por administração na alimentação de ratos e camundongos (Ref. 9, 10) ou por gavagem em ratos machos (Ref. 12).

Em um estudo de dieta de 2 anos (Ref. 9), houve aumentos significativos nos tumores do baço (fibroma, fibrossarcoma, osteossarcoma e sarcoma) em ratos de ambos os sexos, e houve aumentos nos hemangiossarcomas do baço em ambos os sexos, que foram estatisticamente significativos em machos nas doses média e alta (7,7 e 41,2 mg/kg/dia). Foram observadas alterações não neoplásicas do baço, como fibrose e hiperplasia da cápsula. Foi observado um aumento nos feocromocitomas medulares adrenais com a dose elevada que foi estatisticamente significativo em fêmeas (53,8 mg/kg/dia). Nos camundongos, o único aumento significativo nos tumores foi nos hemangiossarcomas hepáticos na dose elevada nas fêmeas (275,2 mg/kg/dia). Distúrbios hematológicos, como diminuição do número de glóbulos vermelhos e hematócrito, bem como hematopoiese extramedular, foram observados em ratos e camundongos.

Em outro estudo de dieta (Ref. 10), o 1-cloro-4-nitrobenzeno não induziu tumores em ratos CD-1 machos quando alimentados na dieta por 18 meses. A concentração na dieta foi ajustada durante o período de 18 meses devido à toxicidade da seguinte forma: O grupo de dose baixa recebeu 2000 ppm nos primeiros 3 meses, 250 ppm nos 2 meses seguintes e 500 ppm de 6 a 18 meses; o grupo de doses elevadas recebeu 4000 ppm nos primeiros 3 meses, 500 ppm nos 2 meses seguintes e 1000 ppm de 6 a 18 meses. A exposição média diária foi de aproximadamente 17 e 33 mg/kg para os grupos de dose baixa e alta, respectivamente. Os ratos foram sacrificados 6 meses após a última dose e examinados quanto a tumores. Não foram observados aumentos nos tumores relacionados ao tratamento nos 11 tecidos examinados (pulmão, fígado, baço, rim, adrenal, coração, bexiga, estômago, intestino, testículos e hipófise).

O mesmo laboratório (Ref. 10) também investigou o potencial carcinogênico do 1-cloro-4-nitrobenzeno em camundongos CD-1 machos e fêmeas, administrados na dieta por 18 meses. Os camundongos foram sacrificados 3 meses após a última exposição e foram examinados 12 tecidos (pulmão, fígado, baço, rim, adrenal, coração, bexiga, estômago, intestino e órgãos reprodutores) quanto à presença de tumores. Foi observado um aumento dependente da dose nos tumores vasculares (hemangiomas ou hemangiossarcomas) do fígado, pulmão e baço em camundongos machos e fêmeas.

Em um estudo oral (Ref. 11), ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas (n = 60) receberam 1-cloro-4-nitrobenzeno por gavagem 5 dias/semana por 24 meses. Em ambos os sexos, observou-se toxicidade: metemoglobinemia nos grupos de dose média e alta e hemossiderina e anemia no grupo de dose elevada.

1-Cloro-4-nitrobenzeno - Detalhes dos estudos de carcinogenicidade

Estudo	Grupo de dose/Animais	Duração/Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/sexo mais sensível do tumor	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 9 ^{*,+}	50/grupo rato F344s macho (SPF)	2 anos (Dieta)	50	3: 40; 200; 1000 ppm. (1,5; 7,7; 41,2 mg/kg/d)	Hemangiossarcomas do baço 7,7 mg/kg/d	173,5
	50/grupo Rato F344s fêmea (SPF)	2 anos (Dieta)	50	3: 40; 200; 1000 ppm. (1,9; 9,8;53,8 mg/kg/d)	Feocromocitoma/ Fêmea 53,8 mg/kg/d	116,9**
	50/grupo Crj:BDF1 macho (SPF)	2 anos (Dieta)	50	3: 125;500; 2000 ppm. (15,3; 60,1;240,1 mg/kg/d)	NA	
	50/grupo Crj:BDF1 fêmea (SPF)	2 anos (Dieta)	50	3: 125;500; 2000 ppm. (17,6; 72,6; 275,2 mg/kg/d)	Hemangiossarcomas hepáticos 275,2 mg/kg/d	1919,9
Ref. 10	14-15/grupo ratos CD-1 machos	Dieta de 18 meses; sacrificados 6 meses após a última dose	16	2: Média 17 e 33 mg/kg; (ver texto) (22,6 e 45,2 mg/kg/d)	NA	Negativo [^]

Estudo	Grupo de dose/Animais	Duração/Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/sexo mais sensível do tumor	TD ₅₀ (mg/kg/d)
	14-20/sexo grupo camundongo CD-1	Dieta de 18 meses; sacrificados 3 meses após a última dose	15/sexo	2: M: 341; 720. F: 351; 780 mg/kg/d	Vascular (hemangiomas/hemangiossarcomas)/Macho	430 [^]
Ref. 11 ⁺	60/sexo/grupo Rato Sprague Dawley	24 meses 5 d/ semana, Gavagem	Sim	3: 0,1; 0,7; 5 mg/kg/d	NA	Negativo

Os estudos listados estão no CPDB (Ref. 12), salvo indicação em contrário.

* Estudo de carcinogenicidade selecionado para o cálculo da AI/EDP.

** TD₅₀ calculado com base em dados de carcinogenicidade (ver nota 1)

+ Não no CPDB.

[^] Histopatologia limitada a 11-12 tecidos.

NA = Não aplicável

Modo de ação para carcinogenicidade

O 1-cloro-4-nitrobenzeno é metabolizado significativamente por redução a 4-cloroanilina (*p*-cloroanilina) em ratos (Ref. 13), coelhos (Ref. 14) e humanos (Ref. 15). Foi demonstrado que a *p*-cloroanilina produz hemangiossarcomas e tumores de baço em ratos e camundongos, semelhante ao 1-cloro-4-nitrobenzeno (Ref. 16). Assim como a anilina, foi indicado um mecanismo indireto para a tumorigênese vascular no fígado e baço, secundário a lesão eritrocitária oxidativa e fibrose e hiperplasia esplênica, tanto para a 4-cloroanilina (Ref. 16) quanto para o 1-cloro-4-nitrobenzeno (Ref. 17). A metahemoglobinemia e a toxicidade associada são um efeito notável do 1-cloro-4-nitrobenzeno. Um mecanismo não linear para indução tumoral é apoiado pelo fato de que, no estudo de gavagem oral (Ref. 11), realizado em doses mais baixas do que nos estudos de dieta (Ref. 9, 10), foram observadas metemoglobinemia e hemossiderina, mas não houve aumento nos tumores.

O tipo de tumor com o TD₅₀ mais baixo foi feocromocitoma medular adrenal em ratos fêmeas (Ref. 9). Este tipo de tumor é comum como um tumor de fundo em ratos F344, especialmente machos, e é observado após o tratamento com vários produtos químicos, muitos deles não mutagênicos (Ref. 18). Foi proposto que esses tumores estivessem associados a vários distúrbios bioquímicos, e o modo de ação para indução de feocromocitomas por substâncias químicas como anilina e *p*-cloroanilina, que são tóxicas para os glóbulos vermelhos, pode ser secundário ao desacoplamento da fosforilação oxidativa (ref. 18) ou talvez hipóxia.

No geral, existem evidências substanciais para um modo de ação não mutagênico, como se segue:

Os tipos mais notáveis de tumores induzidos foram aqueles associados à metahemoglobinemia (tumores do baço e vascular);

Feocromocitomas medulares adrenais podem estar associados às mesmas perturbações;

Existe claramente uma relação de dose não linear (com base em doses sem efeito e nos resultados negativos do estudo de dose mais baixa (Ref. 11).

Contudo, em estudos de mutagenicidade em *Salmonella*, o 1-cloro-4-nitrobenzeno foi mutagênico em *Salmonella* TA100 e TA1535 (mas não TA98 e outras linhagens). Isso pode indicar um componente mutagênico para o modo de ação para indução do tumor pelo 1-cloro-4-nitrobenzeno, e o padrão de mutagenicidade é diferente de seu metabólito *p*-cloroanilina, que não foi consistentemente detectado como mutagênico nos laboratórios e era reprodutivelmente mutagênico apenas em *Salmonella* TA98 com fígado de rato S9 (Ref. 19), indicando diferenças nos metabólitos ou mecanismo mutagênico. Faltam dados de genotoxicidade *in vivo* para ajudar a avaliar o potencial de um modo de ação mutagênico.

Como o 1-cloro-4-nitrobenzeno é mutagênico, e um modo de ação mutagênico não pode ser descartado, um cálculo de AI foi realizado.

Limites regulatórios e/ ou publicados

Nenhum limite regulatório foi publicado, por exemplo, pela EPA dos EUA, pela OMS ou pela Agência de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças [*Agency for Toxic Substances & Disease Registry*] (ATSDR).

Cálculo de AI

O TD₅₀ mais sensível é o dos feocromocitomas medulares adrenais nos ratos fêmeas (Ref. 9).

$$\text{AI vitalícia} = \text{TD}_{50}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 117 \text{ mg/kg/dia}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 117 \text{ } \mu\text{g/dia}$$

Referências

1. Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Speck W, Zeiger E. *Salmonella* mutagenicity test results for 250 chemicals. *Environ Mutagen* 1983;5 Suppl 1:1-142
2. Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology & information Center (JETOC). Japan: Mutagenicity test data of existing chemical substances based on the toxicity investigation system of the Industrial Safety and Health law. 2005 Addendum 3.
3. Kawai A, Goto S, Matsumoto Y, Matsushita H. Mutagenicity of aliphatic and aromatic nitro compounds. *Sangyoigaku* 1987; 29: 34-55.
4. NTP. Technical Report on Toxicity Studies on 2-Chloronitrobenzene and 4- Chloronitrobenzene (CAS Nos. 88-73-3 and 100-00-5) Administered by Inhalation to F344/N Rats and B6C4F1 Mice. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. 1993;NTP TR 33.
5. Cesarone CF, Bolognesi C, Santi L. DNA damage induced *in vivo* in various tissues by nitrobenzene derivatives. *Mutat Res* 1983;116:239-46.

6. Cesarone CF, Fugassa E, Gallo G, Voci A, Orunesu M. Influence of the culture time on DNA damage and repair in isolated rat hepatocytes exposed to nitrochlorobenzene derivatives. *Mutat Res* 1984;131:215-22.
7. IARC. Printing processes and printing inks, carbon black and some nitro compounds. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. World Health Organization, Lyon. 1996.Vol. 65.
8. US Environmental Protection Agency (USEPA). Health Effects Assessment Summary Tables. Office of Solid Waste and Emergency Response, US Environmental Protection Agency, Washington DC. 1995; No. PB95-921199.
9. Matsumoto M., Aiso S, Senoh H, Yamazaki K, Arito H, Nagano K, *et al.* Carcinogenicity and chronic toxicity of para-chloronitrobenzene in rats and mice by two-year feeding. *J. Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006;25:571-84.
10. Weisburger EK, Russfield AB, Homburger F, Weisburger JH, Boger E, Van Dongen, *et al.* Testing of twenty-one environmental aromatic amines or derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity. *J Environ Pathol Toxicol* 1978;2:325-56.
11. Schroeder RE, Daly JW. A chronic oral sonda study in rats with *p*-nitrochlorobenzene. Biodynamics Inc. 1984. Project No. 80-2487. NTIS/OTS 0536382.
12. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
13. Yoshida T, Andoh K, Tabuchi T. Identification of urinary metabolites in rats treated with *p*-chloronitrobenzene. *Arch Toxicol* 1991;65: 52-8.
14. Bray HG, James SP, Thorpe WV. The metabolism of the monochloronitrobenzenes in the rabbit. *Biochem J* 1956;64:38-44.
15. Yoshida T, Tabuchi T, Andoh K. Pharmacokinetic study of *p*-chloronitrobenzene in humans suffering from acute poisoning. *Drug Metab Dispos* 1993;21:1142-6.
16. IARC. Occupational exposures of hairdressers and barbers and personal use of hair colourants; some hair dyes, cosmetic colourants, industrial dyestuffs and aromatic amines. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1993;57.
17. Travlos GS, Mahler J, Ragan HA, Chou BJ, Bucher JR. Thirteen-week inhalation toxicity of 2- and 4-chloronitrobenzene in F344/N rats and B6C3F1 mice. *Fundam Appl Toxicol* 1996;30:75-92.
18. Greim H, Hartwig A, Reuter U, Richter-Reichel HB, Thielman HW. Chemically induced pheochromocytomas in rats: mechanisms and relevance for human risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 2009;39:695-718.

19. WHO. CICAD 48: Concise International Chemical Assessment Document 48 *p*- Chloroaniline. Geneva. [Online]. 2003; Available from: URL: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad48.htm>

***p*-cresidina (2-metoxi-5-metil anilina, N° CAS 120-71-8)**

Potencial de exposição humana

O potencial de exposição está no uso industrial. Não há dados disponíveis para a exposição da população em geral.

Mutagenicidade/ Genotoxicidade

A *p*-cresidina é mutagênica/ genotóxica *in vitro* com evidência equívoca de genotoxicidade *in vivo*.

A *p*-cresidina é mutagênica em:

Várias linhagens de *Salmonella* na presença de ativação metabólica (Ref. 1, 2, 3).

Modelo de camundongo transgênico *Big Blue* com o gene *lacI*; *p*-cresidina foi administrada em uma dieta de 0,25 e 0,5%, comparável às doses no estudo de carcinogenicidade, por 180 dias (Ref. 4).

In vivo, a *p*-cresidina não induziu micronúcleos na medula óssea de camundongos (Ref. 5, 6, 7) ou em camundongos *p53* heterozigotos ou nulizigóticos (Ref. 8). Aumentos nos micronúcleos em outro estudo em camundongos heterozigotos *p53* podem ser secundários à metemoglobinemia e anemia regenerativa, como ocorre com a anilina e compostos relacionados (Ref. 9).

Não foram observadas quebras na cadeia de DNA usando o método de eluição alcalina em vários tecidos, incluindo a bexiga (Ref. 6; 7), mas quebras na cadeia de DNA avaliadas pelo ensaio Comet foram relatadas na mucosa da bexiga, mas não em outros tecidos, após tratamento oral de camundongos com *p*-cresidina (referência 10).

Carcinogenicidade

A *p*-cresidina é classificada pela IARC como um carcinógeno do Grupo 2B, ou possivelmente carcinogênico em humanos (Ref. 11).

Existe apenas um conjunto de estudos de carcinogenicidade no modelo padrão de roedores. Em estudos da NTP (Ref. 5), tumores induzidos por *p*-cresidina em estudos ao longo da vida em ratos Fischer 344 e camundongos B6C3F1, com *p*-cresidina administrada na ração. Não existem dados de carcinogenicidade disponíveis para outras vias de exposição.

A *p*-cresidina foi administrada na ração, a grupos de 50 machos e 50 fêmeas de cada espécie. Havia também 50 animais controle de cada sexo. As concentrações de *p*-cresidina foram de 0,5 ou 1,0 por cento na dieta, mas em camundongos as concentrações administradas foram reduzidas após 21 semanas para 0,15 e 0,3 por cento. Os níveis de dose, convertidos em mg/kg/dia no CPDB (Ref. 12), foram 198 e 368 mg/kg/dia para ratos machos; 245 e 491 mg/kg/dia para ratos fêmeas; 260 e 552 mg/kg/dia para camundongos machos e 281 e 563 mg/kg/dia para camundongos fêmeas.

Todos os animais administrados, com exceção de camundongos machos de dose elevada, receberam *p*-cresidina na dieta por 104 semanas e foram observados por um período adicional de até 2 semanas. Todos os camundongos machos de dose elevada estavam mortos no final da semana 92. As taxas de mortalidade estavam relacionadas à dose para ambos os sexos de ambas as espécies. O fato de que a incidência de certos tumores foi maior em doses baixas do que em grupos de doses elevadas deve-se provavelmente à mortalidade acelerada nos grupos de doses elevadas.

Em ratos dosados de ambos os sexos, foram observadas incidências estatisticamente significativas de carcinomas da bexiga (incidência combinada de carcinomas papilares, carcinomas de células escamosas, papilomas de células de transição, carcinomas de células de transição e carcinomas não diferenciados) e neuroblastomas olfativos. A incidência combinada de nódulos neoplásicos do fígado, carcinomas hepatocelulares ou hepato/colangiocarcinomas mistos também foi significativa em ratos machos com dose baixa. Nos camundongos machos e fêmeas, a incidência de carcinomas da bexiga (incidência combinada de carcinomas, carcinomas de células escamosas e carcinomas de células de transição) foi significativa. A incidência de carcinomas hepatocelulares foi significativa em camundongos fêmeas administradas.

Em resumo, a *p*-cresidina foi cancerígena em ratos Fischer 344, causando aumento da incidência de carcinomas e papilomas da bexiga em ambos os sexos, aumento da incidência de neuroblastomas olfativos em ambos os sexos e tumores hepáticos em machos. A *p*-cresidina também foi cancerígena em camundongos B6C3F1, causando carcinomas nas bexigas em ambos os sexos e carcinomas hepatocelulares em fêmeas.

A indução de tumores da bexiga também foi observada em um modelo de carcinogenicidade a curto prazo em camundongos p53 +/- hemizigóticos. A *p*-cresidina foi usada como controle positivo em uma grande avaliação interlaboratorial do modelo de camundongo (Ref. 13). Foram observados aumentos nos tumores da bexiga em 18 de 19 estudos nos quais a *p*-cresidina foi administrada por gavagem a 400 mg/kg/dia durante 26 semanas e no único estudo em que o composto foi administrado na ração.

***p*-Cresidina - Detalhes dos estudos de carcinogenicidade**

Estudo	Grupo de dose/Animais	Duração/Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/sexo mais sensível do tumor	TD₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 5*	50/sexo/ grupo Camundongo B6C3F1	2 anos Alimentação	50	2: 0,5 e 1% reduzido após 21 sem. para 0,15 e 0,3%. M: 260; 552. F: 281; 563 mg/kg/d	Bexiga/Macho	44,7
Ref. 5	50/sexo/ grupo Ratos Fisher 344	2 anos Alimentação	50	0,5 e 1% M: 198; 396. F: 245; 491 mg/kg/d	Bexiga/Macho	88,4

* Estudo de carcinogenicidade selecionado para o cálculo da AI.
Os estudos listados estão no CPDB (Ref. 12).

Modo de ação para carcinogenicidade

A *p*-cresidina é um carcinógeno mutagênico e a ingestão aceitável é calculada por extrapolação linear do TD₅₀.

Limites regulatórios e/ ou publicados

Nenhum limite regulatório foi publicado

Ingestão aceitável (AI)

Justificativa para a seleção do estudo para o cálculo da AI:

Os únicos estudos adequados de carcinogenicidade da *p*-cresidina foram os relatados no CPDB e conduzidos pelo NCI/NTP (Ref. 5). O estudo em camundongos foi selecionado para derivação da AI, uma vez que o TD₅₀ mais sensível foi baseado em tumores da bexiga em camundongos machos.

Cálculo de AI

Os valores TD₅₀ mais sensíveis dos estudos NCI/NTP são para a bexiga em ambos os sexos de ratos e camundongos; em ratos, o TD₅₀ foi de 110 mg/kg/dia para as fêmeas e 88,4 mg/kg/dia para os machos; nos camundongos, o TD₅₀ foi de 69 mg/kg/dia para as fêmeas e 44,7 mg/kg/dia para os machos. O valor mais conservador é o identificado para camundongos machos.

A AI vitalícia é calculada da seguinte forma:

$$\text{AI vitalícia} = \text{TD}_{50}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 44,7 \text{ mg/kg/dia}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

AI vitalícia = 45 µg/dia

Referências

1. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K. *Salmonella* mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. Environ Mol Mutagen 1988;11 Suppl 12:1-158.
2. Dunkel VC, Zeiger E, Brusick D, McCoy E, McGregor D, Mortelmans K, *et al.* Reproducibility of microbial mutagenicity assays: II. Testing of carcinogens and noncarcinogens in *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. Environ Mutagen 1985;7 Suppl 5:1-248.
3. Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology and Information Center (JETOC); Mutagenicity test data of existing chemical substances based on the toxicity investigation of the Industrial Safety and Health law; 1997; Suppl.
4. Jakubczak JL, Merlino G, French JE, Muller WJ, Paul B, Adhya S *et al.* Analysis of genetic instability during mammary tumor progression using a novel selection-based assay for *in vivo* mutations in a bacteriophage γ transgene target. Proc Natl Acad Sci (USA) 1996; 93(17):9073-8.
5. NCI. Technical report on the Bioassay of *p*-cresidine for possible carcinogenicity. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. 1979; TR 142.
6. Ashby J, Lefevre PA, Tinwell H, Brunborg G, Schmezer P, Pool-Zobel B, *et al.* The non-genotoxicity to rodents of the potent rodent bladder carcinogens *o*-anisidine and *p*-cresidine. Mutat Res 1991;250:115-133.
7. Morita T, Norihide A, Awogi T, Sasaki Yu F, Sato-S-I, Shimada H, *et al.* Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Groups 1, 2A and 2B). The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. Mutat Res 1997;389:3-122.
8. Delker DA, Yano BL, Gollapudi BB. Evaluation of cytotoxicity, cell proliferation, and genotoxicity induced by *p*-cresidine in hetero- and nullizygous transgenic p53 mice. Toxicol Sci 2000;55:361-9.
9. Stoll RE, Blanchard KT, Stoltz JH, Majeski JB, Furst S, Lilly PD *et al.* Phenolphthalein and nisacodyl: Assessment of genotoxic and carcinogenic responses in heterozygous p53 (+/-) mice and Syrian Hamster Embryo (SHE) assay. Toxicol Sci 2006;90:440-50.
10. Sasaki YF, Nishidate E, Su YQ, Matsusaka N, Tsuda S, Susa N, *et al.* Organ-specific genotoxicity of the potent rodent bladder carcinogens *o*-anisidine and *p*-cresidine. Mutat Res 1998;412:155-60.
11. IARC. para-Cresidine. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. World Health Organization, Lyon. 1982;27:92. reviewed in Suppl 7 1987.

12. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
13. Storer RD, French JE, Haseman J, Hajian G, LeGran EK, Long GD, *et al.* p53^{+/-} hemizygous knockout camundongo: Overview of available data. *Toxicologic Pathol* 2001; 29 Suppl:30-50.

Cloreto de dimetilcarbamil (N° CAS 79-44-7)

Potencial de exposição humana

O potencial de exposição está no uso industrial. Não há dados disponíveis para a exposição da população em geral.

Mutagenicidade/ genotoxicidade

O cloreto de dimetilcarbamil (DMCC) é considerado mutagênico e genotóxico *in vitro* e *in vivo*.

O DMCC foi mutagênico em:

Salmonella typhimurium TA100, TA1535, TA1537, TA98 e TA1538 com e sem ativação metabólica (Ref. 1, 2);

In vivo, foram observados resultados positivos no ensaio de micronúcleos (Ref. 3).

Carcinogenicidade

O DMCC é classificado pela IARC como um composto do Grupo 2A, ou provavelmente carcinogênico para seres humanos (Ref. 4).

Não foram relatadas mortes por câncer em um pequeno estudo de trabalhadores expostos por períodos que variaram de 6 meses a 12 anos, e há evidências inadequadas em humanos para a carcinogenicidade do DMCC. Há evidências de que o DMCC induziu tumores em roedores.

Como faltam estudos orais, os estudos considerados para derivação de AI usaram inalação e administração intraperitoneal.

Os hamsters Syrian golden foram expostos a 1 ppm de DMCC por inalação por 6 horas/dia, 5 dias/semana até o final de suas vidas ou sacrifício devido à moribundidade (Ref. 5). O carcinoma de células escamosas da cavidade nasal foi observado em 55% dos animais, enquanto não foram observados tumores nasais espontâneos nos controles ou controles históricos. Quando a mortalidade precoce foi levada em consideração, a porcentagem de animais portadores de tumores foi calculada em 75% (Ref. 5).

O DMCC foi testado quanto à atividade carcinogênica em camundongos ICR/Ha Swiss fêmeas por aplicação na pele, injeção subcutânea e injeção intraperitoneal (i.p.) (Ref. 6; esse estudo foi selecionado para calcular a AI). Na aplicação cutânea, 2 mg de DMCC foram aplicados 3 vezes por semana durante 492 dias; isto foi visto como induzindo papilomas em 40/50 camundongos e carcinomas em 30/50 camundongos. A injeção subcutânea uma vez por semana foi continuada por 427 dias na dose de 5 mg/semana. Sarcomas e carcinomas de células escamosas foram observados em 36/50 e 3/50 camundongos, respectivamente, após a injeção subcutânea. No experimento i.p., os camundongos foram injetados semanalmente com 1 mg de DMCC por uma duração total de 450 dias. O tratamento induziu tumores papilares do pulmão em 14/30 animais e tumores malignos locais em 9/30 animais (8/30 eram sarcomas). Nos grupos controle, nenhum tumor foi observado por aplicação na pele, 1/50 sarcoma por injeção subcutânea e 1/30 sarcoma e 10/30 tumores papilares de pulmão por injeção i.p.. No geral, apenas os tumores locais (local da injeção) aumentaram significativamente; os tumores em locais distantes não aumentaram estatisticamente de forma significativa em comparação com os controles.

Cloreto de dimetilcarbamilo - Detalhes dos estudos de carcinogenicidade

Estudo	Grupo de dose/ Animais	Duração/ Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/sexo mais sensível do tumor	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 6*	30 Camundongos ICR/Ha Swiss fêmeas	64 semanas Uma vez/sem. Intraperitoneal	30	1: 1 mg 5,71 mg/kg/d	Local da injeção: tumores malignos/ Fêmea	4,59 ^{^^}
Ref. 5**	99 Hamsters Syrian golden machos	6 h/d vitalício, 5 d/sem. Inalação	50 tratados com placebo 200 sem tratamento	1: 1 ppm 0,553 mg/kg/d	Carcinoma de células escamosas da cavidade nasal	0,625
Ref. 6	50 Camundongos ICR/Ha Swiss fêmeas	70 semanas 3 vezes/sem. Pele	50	1: 2 mg	Pele: Papilomas e carcinomas/ Fêmea	NA [^]
Ref. 6	50 Camundongos ICR/Ha Swiss fêmeas	61 semanas Uma vez/sem. Subcutâneo	50	1: 5 mg	Local da injeção: fibrossarcomas; Carcinomas de células escamosas/ Fêmea	NA [^]
Ref. 7	Ratos Sprague-Dawley Machos	6 semanas 6 h/d, 5 d/sem. Inalação; examinado no final da vida	Sim	1: 1 ppm	Tumores nasais/ macho	NA ^{^^^^}
Ref. 8	30-50 Camundongos ICR/Ha Swiss fêmeas	18-22 meses 3 vezes/sem. Pele	Sim	2: 2 and 4,3 mg	Pele. Principalmente carcinoma escamoso da pele/ Fêmea	NA [^]
Ref. 8	Camundongos ICR/Ha Swiss fêmeas	18-22 meses Uma vez/sem. Subcutâneo	Sim	1: 4,3 mg	Local de administração. Principalmente sarcoma. Hemangioma, carcinoma escamoso e papiloma também observados/ Fêmea	NA ^{^^}
Ref. 8	Camundongos ICR/Ha Swiss fêmeas	12 meses Uma vez/sem. Subcutâneo; examinado no final da vida	Sim	2: 0,43 r 4,3 mg		NA ^{^^}

Os estudos listados estão no CPDB (Ref. 9), salvo indicação contrária.

* Estudo de carcinogenicidade selecionado para AI sem inalação.

** Estudo de carcinogenicidade selecionado para AI de inalação.

NA = Não aplicável

[^]Não examinou todos os tecidos histologicamente. Os estudos subcutâneos e de pintura de pele não são incluídos no CPDB, pois a via com maior probabilidade de exposição ao corpo inteiro é considerada mais valiosa.

^{^^}Os estudos subcutâneos e de pintura de pele não são incluídos no CPDB, pois a via com maior probabilidade de exposição ao corpo inteiro é considerada mais valiosa.

^{^^^}Histopatologia apenas em tecidos que pareciam anormais na autópsia.

^{^^^^}Examinado apenas para câncer nasal. Não atende aos critérios de inclusão no CPDB de exposição por pelo menos um quarto da vida útil padrão.

Limites regulatórios e/ ou publicados

Nenhum limite regulatório foi publicado.

Ingestão aceitável (AI)

Com base nos dados acima, o DMCC é considerado um carcinógeno mutagênico. Como resultado, a extrapolação linear do TD₅₀ mais sensível nos estudos de carcinogenicidade é um método apropriado para derivar uma dose de risco aceitável. Como o DMCC parece ser um agente carcinogênico no local de contato, era apropriado derivar uma AI separada para exposição por inalação em comparação com outras vias de exposição.

Nenhuma informação da administração oral está disponível, de modo que, para outras vias de exposição que não a inalação, foi utilizado o estudo de Van Duuren *et al.* (Ref. 6) com administração de injeção i.p.. O TD₅₀ foi de 4,59 mg/kg/dia com base em incidências mistas de tumores (CPDB).

A AI vitalícia é calculada da seguinte forma:

$$\text{AI vitalícia} = \text{TD}_{50}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 4,59 \text{ mg/kg/dia}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 5 \text{ } \mu\text{g/dia}$$

AI por Inalação

A AI por inalação é calculada da seguinte forma:

Após a inalação do DMCC, o câncer nasal em hamsters é o desfecho mais sensível e o TD₅₀ foi de 0,625 mg/kg/dia.

$$\text{AI vitalícia} = \text{TD}_{50}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 0,625 \text{ mg/kg/dia}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia por Inalação} = 0,6 \text{ } \mu\text{g/dia}$$

Referências

1. Dunkel V, Zeiger E, Brusick D, McCoy E, McGregor D, Mortelmans K, *et al.* Reproducibility of microbial mutagenicity assays. I. Tests with *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* using a standardized protocol. *Environ Mutagen* 1984;6 Suppl 2:1- 251.

2. Kier LD, Brusick DJ, Auletta AE, Von Halle ES, Brown MM, Simmon VF, *et al.* The *Salmonella* typhimurium/mammalian microsomal assay. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1986;168:69-240.
3. Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, *et al.* The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 1983;123:61-118.
4. IARC. Monographs on the evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Geneva: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. [Online] 1972-PRESENT. (Multivolume work). 1999;71:539. Available from: URL: <http://monographs.iarc.fr/index.php>
5. Sellakumar AR, Laskin S, Kuschner M, Rush G, Katz GV, Snyder CA, *et al.* Inhalation carcinogenesis by dimethylcarbamoyl chloride in Syrian golden hamsters. *J Environ Pathol Toxicol* 1980;4:107-15.
6. Van Duuren BL, Goldschmidt BM, Katz C, Seidman I, Paul JS. Carcinogenic activity of alkylating agents. *J Natl Cancer Inst* 1974;53:695-700.
7. Snyder CA, Garte SJ, Sellakumar AR, Albert RE. Relationships between the levels of binding to DNA and the carcinogenic potencies in rat nasal mucosa for three alkylating agents, *Cancer Lett* 1986;33:175-81.
8. Van Duuren BL, Melchionne S, Seidman I. Carcinogenicity of acylating agents: chronic bioassays in mice and Structure-Activity Relationships (SARC). *J Am Col Toxicol* 1987;6:479-487.
9. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>

Sulfato de dimetila (Nº CAS 77-78-1)

Potencial de exposição humana

O sulfato de dimetila (DMS) é encontrado no ar ambiente com concentração média de 7,4 µg por metro cúbico ou 1,4 ppb com base em dados de 1983 compilados em um único local pela EPA dos EUA (Ref. 1).

Mutagenicidade/ genotoxicidade

O DMS é mutagênico/ genotóxico *in vitro* e *in vivo* (Ref. 2).

O DMS é mutagênico em:

O ensaio de mutação microbiana reversa (Ames), linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 e TA1538 com e sem ativação (Ref. 3).

In vivo, o DMS forma bases de DNA alquiladas e é consistentemente positivo em estudos de genotoxicidade (Ref. 4). Níveis elevados de aberrações cromossômicas foram observados em linfócitos circulantes de trabalhadores expostos a DMS (Ref. 4).

Carcinogenicidade

O DMS é classificado pela IARC como um carcinógeno do Grupo 2A, provavelmente carcinogênico para seres humanos (Ref. 4).

Não existem estudos epidemiológicos disponíveis para o DMS, embora tenha sido relatado um pequeno número de casos de exposição humana e carcinoma brônquico. O DMS é carcinogênico em animais por inalação crônica e subcrônica e injeções subcutâneas únicas e múltiplas; no entanto, o DMS não foi testado pela via oral de exposição. O DMS é carcinogênico em ratos, camundongos e hamsters (Ref. 4). Os estudos de carcinogenicidade para o DMS foram limitados por vários motivos e é provavelmente por isso que o DMS não está listado no banco de dados de potência de carcinogenicidade (CPDB). Os estudos que avaliam a carcinogenicidade do DMS são descritos abaixo (extraído da EPA dos EUA, Ref. 5).

DMS – Detalhes dos estudos de carcinogenicidade

Estudo	Grupo de dose/ Animais	Duração/ Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/ sexo mais sensível do tumor	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 6	Hamsters dourados, ratos Wistar e camundongos NMRI machos e fêmeas (número não especificado claramente)	15 meses 6 h/d, 2 d/sem. seguida de 15 meses de observação Inalação	Sim	2: 0,5; 2,0 ppm	Tumores nos pulmões, tórax e passagens nasais nas duas doses	NA [^]
Ref. 7	20-27 Ratos BD Sexo não especificado	130 dias 1 h/d, 5 d/sem. seguido de 643 dias de observação Inalação	Não	2: 3; 10 ppm	Carcinoma de células escamosas no epitélio nasal a 3 ppm. Carcinomas de células escamosas no epitélio nasal e linfossarcoma no tórax com metástases no pulmão a 10 ppm.	NA ^{^^}
Ref. 8	8-17 Ratos BD Sexo não especificado	394 dias A duração do estudo não foi relatada, mas o tempo médio de indução do tumor foi de 500 dias Subcutâneo	Não	2: 8; 16 mg/kg/sem.	Sarcomas no local da injeção em 7/11 em dose baixa e 4/6 em dose alta; metástases ocasionais no pulmão. Um carcinoma hepático.	NA ^{^^^}
Ref. 7	15 Ratos BD Sexo não especificado	Avaliação até 740 dias Após injeção única Subcutâneo	Não	1: 50 mg/kg	Sarcomas locais de tecido conjuntivo em 7/15 ratos; múltiplas metástases nos pulmões em três casos	NA ^{^^^}
Ref. 7	12 Ratos BD Sexo não especificado	800 dias Uma vez/sem. Intravenoso	Não	2: 2; 4 mg/kg	Nenhum tumor relatado	NA ^{^^^}

Estudo	Grupo de dose/ Animais	Duração/ Exposição	Controles	Doses	Local/tipo /sexo mais sensível do tumor	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 7	8 Ratos BD (fêmeas prenhas)	1 ano de observação da prole após dose única, dia 15 da gestação Intravenosa	Não	1: 20 mg/kg	4/59 da prole tiveram tumores malignos do sistema nervoso, enquanto 2/59 tiveram tumores hepáticos malignos.	NA ^{^^^^}
Ref. 9	90 Camundongos CBAX57 Bl/6 fêmeas	Duração não reportada 4 h/d, 5 d/sem. Inalação	Não indicado	3: 0,4; 1; 20mg/m ³	Aumento de adenomas pulmonares em doses elevadas	NA*
Ref. 10	20 Camundongos ICR/Ha Swiss ‡	475 dias 3 vezes/sem. Dérmica	Não indicado	1: 0,1 mg	Sem achados	NA**

Os estudos listados não estão no CPDB.

NA = Não aplicável

[^]Dados de controle não relatados. Incidências tumorais não tabuladas por espécie ou dose.

^{^^}Tamanho do grupo pequeno. Nenhum grupo de controle simultâneo. Um rato em dose elevada teve um tumor cerebelar e dois em baixa dose tiveram tumores do sistema nervoso muito raros e distantes da exposição.

^{^^^}Tamanho do grupo pequeno, sem grupo de controle simultâneo.

^{^^^^}Nenhum grupo de controle simultâneo.

*Duração não informada

**Número limitado de animais. Apenas uma dose testada. Mesmo quando o DMS foi combinado com promotores de tumores, nenhum tumor foi observado.

‡ Sexo não especificado

Modo de ação para carcinogenicidade

O sulfato de dimetil é um carcinógeno mutagênico e a ingestão aceitável é calculada por extrapolação linear do TD₅₀.

Limites regulatórios e/ ou publicados

O Instituto de Saúde e Proteção ao Consumidor da União Europeia (UE) (ECHA, Ref.11) desenvolveu uma curva de inclinação de carcinogenicidade com base nos dados de carcinogenicidade por inalação para o DMS. O ECHA calculou um T₂₅ (dose que resultou em um aumento de 25% nos tumores) usando o estudo de inalação em ratos (Ref. 7). Efeitos sistêmicos (sistema nervoso) e tumores nasais locais foram observados nesse estudo limitado de carcinogenicidade. No entanto, como em outros estudos listados, esse estudo foi severamente limitado com alta mortalidade, sem animais de controle, apenas 2 grupos de dose e avaliações patológicas mínimas; portanto, o estudo não foi adequado para extrapolação linear.

Ingestão aceitável (AI)

Embora o DMS seja considerado um provável carcinógeno oral e provável carcinógeno para humanos, não há estudos de carcinogenicidade oral dos quais derivar um valor de TD₅₀. Além disso, os estudos de inalação disponíveis são limitados por várias razões e não são adequados para a extrapolação de TD₅₀. Diante disso, é razoável limitar o DMS ao limiar do nível toxicológico preocupante de vida útil (TTC) de 1,5 µg/dia.

AI vitalícia = 1,5 µg/dia

Referências

1. US EPA. Health and Environmental effects profile for dimethyl sulfate. Prepared by the Office of Health and Environmental Assessment, Environmental Criteria and Assessment Office, Cincinnati, OH for the Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington, DC. 1985.
2. Hoffmann GR. Genetic effects of dimethyl sulfate, diethyl sulfate, and related compounds. *Mutat Res* 1980;75:63-129.
3. Skopek TR, Liber HL, Kaden DA, Thilly WG. Relative sensitivities of forward and reverse mutation assays in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:4465-9.
4. IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1999;71:575
5. US Environmental Protection Agency. Dimethyl sulfate (CASRN 77-78-1). Integrated Risk Information System (IRIS). [Online]. 1988. Available from: URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0365_summary.pdf#name=ddest=woe
6. Schlogel FA, Bannasch P. Carcinogenicity and Chronic Toxicity of Inhaled Dimethyl Sulfate. (In German) (Inaugural Dissertation) Julius-Maximilians University, Wurzburg 1972. (data in Ref. 11).
7. Druckrey H. Carcinogenic alkylating compounds: III. Alkyl halogenids, sulfates, sulfonates, and heterocyclics. (Article in German) *Z. Krebsforsch* 1970;74:241–273.
8. Druckrey H. Carcinogenic alkylating compounds: I. Dimethyl sulfate, carcinogenic effect in rats and probable cause of occupational cancer. (Article in German) *Z. Krebsforsch* 1966; 68:103–111.
9. Fomenko VN, Katasova LD, Domshlak MG (1983); USSR Minist Health All-Union Sci Soc Med Genet 1:348-49 as cited in WHO; Environ Health Criteria 1985; Dimethyl Sulfate p.36
10. Van Duuren BL, Goldschmidt BM, Katz C, Seidman I, Paul JS. Carcinogenic activity of alkylating agents. *J Natl Cancer Inst* 1974;53:695-700.
11. ECHA (European Chemical Agency). European Union Risk Assessment Report: Institute for Health and Consumer Protection. Dimethyl Sulphate. [Online]. 2002 Vol. 12. Available from: URL: <http://echa.europa.eu/documents/10162/3d2e4243-8264-4d09-a4ab-92dde5abfadd>

Cloreto de etila (cloroetano, N° CAS 75-00-3)

Potencial de exposição humana

Baixos níveis (partes por trilhão) de ar ambiente contaminado e água potável. Contato dérmico como anestésico tópico.

Mutagenicidade/ genotoxicidade

O cloreto de etila é mutagênico e genotóxico *in vitro*, mas não *in vivo*. A IARC (Ref. 1) revisou os dados de mutagenicidade para o cloreto de etila; os principais pontos estão resumidos aqui.

O cloreto de etila foi mutagênico em:

Ensaio de mutação microbiana reversa (Ames), linhagens de *Salmonella typhimurium* TA100 e TA1535 e em *Escherichia coli* WP2uvrA com e sem ativação metabólica quando testado em condições que permitem a exposição a gases (Ref. 2, 3, 4);

Ensaio *hprt* de células CHO com e sem ativação metabólica.

O cloreto de etila *in vivo* foi negativo em um teste de micronúcleo da medula óssea de camundongo após inalação a aproximadamente 25.000 ppm por 3 dias e em um ensaio de Síntese de DNA Não Programado (UDS) em fígado de camundongo fêmea (Ref. 5).

Carcinogenicidade

O cloreto de etila foi designado pela IARC como Classe 3 ou não classificável quanto à sua carcinogenicidade (Ref. 1).

Apenas um estudo de carcinogenicidade foi encontrado para o cloreto de etila, estudos do NTP (Ref. 6) em ratos e camundongos de ambos os sexos por inalação por 6 h/dia, 5 dias/semana por 100 semanas. A concentração de exposição única (15.000 ppm) testada foi limitada por questões de segurança (risco de explosão) e pela falta de efeito óbvio em um estudo de três meses até 19.000 ppm. Esses dados foram posteriormente avaliados pela EPA dos EUA (Ref. 7), comparando cloreto de etila com brometo de etila. O cloreto de etila foi notável porque, junto com o brometo de etila estruturalmente semelhante, induziu um número muito alto de tumores uterinos incomuns (carcinomas endometriais) em camundongos, mas não em ratos. O cloreto de etila produziu evidências claras de carcinogenicidade em camundongos fêmeas (útero) e evidências equívocas de carcinogenicidade em ratos machos e fêmeas. Devido à baixa sobrevivência, o estudo com camundongos machos foi considerado inadequado, embora houvesse um aumento na incidência de tumores pulmonares.

Cloreto de etila – Detalhes dos estudos de carcinogenicidade

Estudo	Grupo de dose/ Animais	Duração/ Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/sexo mais sensível do tumor	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 6, 7*	50/sexo/ grupo Camundongo B6C3F1	100 semanas 6 h/d, 5 d/sem. Inalação	50	1: M: 10,4 F: 12,4 g/kg/d	Útero/ Fêmea	1810

Ref. 6, 7	50/sexo/ grupo Ratos Fischer 344	100 semanas 6 h/d, 5 d/sem. Inalação	50	1: M: 2,01 F: 2,88 g/kg/d	Negativo	NA
-----------	--	---	----	---	----------	----

* Estudo de carcinogenicidade selecionado para o cálculo da AI. Os estudos listados estão no CPDB (Ref. 8).

NA = Não aplicável

Modo de ação de carcinogenicidade

Holder (Ref. 7) propõe que metabólitos reativos podem contribuir para a carcinogenicidade, mas observa que camundongos fêmeas têm uma resposta acentuada ao estresse à exposição ao cloreto de etila nas elevadas concentrações usadas no estudo de carcinogenicidade; foi demonstrado que esse estresse leva à estimulação adrenal. Foi proposto que a alta produção de corticosteroides poderia promover o desenvolvimento de cânceres endometriais em camundongos.

Limites regulatórios e/ ou publicados

A EPA dos EUA estabeleceu uma Concentração de Referência por inalação (RfC) para efeitos não carcinogênicos de 10 mg/m³, ou 288 mg/dia, supondo um volume respiratório de 28.800 L/dia (Ref. 9).

Ingestão aceitável (AI)

Fundamentação da seleção do estudo para o cálculo da AI

Embora os estudos não tenham um desenho robusto (com um grupo de dose única), o alto nível de um tipo raro específico de carcinoma uterino de origem endometrial em camundongos (43/50 afetados em comparação com 0/49 controles) sugerem uma forte resposta carcinogênica. A observação é apoiada pelo fato de que o mesmo tipo de tumores (tumores uterinos em camundongo) foi observado com uma molécula comparadora de brometo de etila, em um estudo de carcinogenicidade mais robusto com 3 doses e um controle (Ref. 10).

O cloreto de etila é considerado um carcinógeno mutagênico. Com base no estudo de inalação do NTP, a espécie/ local mais sensível é o útero de camundongos. Como o número de tumores é alto, é possível calcular um TD₅₀ mesmo que apenas uma dose tenha sido testada. Os autores do CPDB (Ref. 8) converteram 0 e 15.000 ppm em doses de 0 e 12,4 g/kg e calcularam um TD₅₀ de 1810 mg/kg/dia para tumores uterinos de camundongo.

$$AI \text{ vitalícia} = TD_{50}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$AI \text{ vitalícia} = 1810 \text{ mg/kg/dia}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$AI \text{ vitalícia} = 1.810 \text{ } \mu\text{g/dia}$$

Referências

1. IARC. Chloroethane. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1999;71:1345.
2. Goto S, Shiraishi F, Tanabe K, Endo O, Machii K, Tezuka Y, *et al.* Mutagenicity Detection Method for Vinyl Chloride and Vinylidene Chloride Gases. *Kankyo Kagaku* 1995; 5(2):235-40.
3. Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K. *Salmonella* mutagenicity tests. V. Results from the testing of 311 chemicals. *Environ Mol Mutagen* 1992; 19 Suppl 21:2-141.
4. Araki A, Noguchi T, Kato F, Matsushima T. Improved method for mutagenicity testing of gaseous compounds by using a gas sampling bag. *Mutat Res* 1994; 307(1):335-44.
5. Ebert R, Fedtke N, Certa H, Wiegand HJ, Regnier JF, Marshall R, *et al.* SW. Genotoxicity Studies With Chloroethane. *Mutat Res* 1994; 322(1):33-43.
6. NCI/NTP Technical Report on the toxicology and carcinogenesis studies of chloroethane. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. NTP TR 346 1989. [Online]. 1989; Available from: URL: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr346.pdf
7. Holder JW. Analysis of Chloroethane Toxicity and Carcinogenicity Including a Comparison With Bromoethane. *Toxicology and Industrial Health* 2008; 24(10):655-675.
8. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
9. US Environmental Protection Agency. Ethyl Chloride (CAS# 75-00-3). Integrated Risk Information System (IRIS).. [Online] 1991. Available from: URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris2/chemicalLanding.cfm?substance_nmbr=523
10. NTP. Technical Report on the toxicology and carcinogenesis studies of Ethyl Bromide. National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. NTP TR 363. [Online]. 1989; Available from: URL: http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr363.pdf

Glicidol (N° CAS 556-52-5)

Potencial de exposição humana

O aquecimento de glicerol e açúcares causa a formação de glicidol. O glicidol é um metabólito do 3-monocloropropano-1, 2-diol, um cloropropanol encontrado em muitos alimentos e ingredientes alimentares, incluindo molho de soja e proteína vegetal hidrolisada. A exposição diária potencial ao glicidol nos alimentos foi estimada em 20-80 µg/dia (Ref. 1).

Mutagenicidade/ genotoxicidade

O glicidol é mutagênico/ genotóxico *in vitro* e *in vivo*.

IARC (Ref. 2) e CCRIS (Ref. 3) contêm revisões dos dados de mutagenicidade/ genotoxicidade para o glicidol; as principais conclusões estão resumidas aqui.

O glicidol é mutagênico em:

Ensaio de mutação microbiana reversa (Ames), linhagens de *Salmonella* TA100, TA1535, TA98, TA97 e TA1537, com e sem ativação de S9 no fígado de rato e em ensaios padrão de placa e pré-incubação.

Linhagem de *Escherichia coli* WP2uvrA/pKM101 em um ensaio de pré-incubação com e sem S9 de fígado de rato.

In vivo, o glicidol foi positivo em um ensaio de micronúcleo de camundongo por gavagem oral em camundongos haploinsuficientes P16Ink4a/p19Arf machos e fêmeas.

Carcinogenicidade

O glicidol é classificado pela IARC como Grupo 2A, ou provavelmente carcinogênico em seres humanos (Ref. 2).

Nos estudos do NTP (Ref. 4, 5), o glicidol foi administrado por gavagem em água a ratos F344/N machos e fêmeas e camundongos B6C3F1. Os ratos receberam 0, 37,5 ou 75 mg/kg e os camundongos receberam 0, 25 ou 50 mg/kg diariamente, 5 dias por semana, durante 2 anos. As doses diárias médias foram calculadas multiplicando a dose administrada por 5/7 para contabilizar o esquema de doses de 5 dias por semana e por 103/104 para contabilizar a duração da dose menor que toda vida. As doses diárias médias resultantes foram de 0, 26,5 e 53,1 mg/kg/dia em ratos machos e fêmeas, e 0, 17,7 e 35,4 mg/kg/dia em camundongos machos e fêmeas.

A exposição ao glicidol foi associada a aumentos relacionados à dose nas incidências de neoplasias em vários tecidos, tanto em ratos (tumores da glândula mamária em fêmeas) quanto em camundongos (glândula de Harder). A sobrevivência de ratos e camundongos tratados foi marcadamente reduzida em comparação aos controles devido à indução precoce da doença neoplásica.

O estudo da gavagem oral em hamsters foi menos robusto devido ao tamanho pequeno do grupo, níveis de dose única e menor duração. Outros estudos crônicos de gavagem oral com glicidol foram conduzidos pelo NTP em camundongos geneticamente modificados sem dois genes supressores de tumor (isto é, camundongos haploinsuficientes p16Ink4a/p19Arf) (Ref. 6). Embora houvesse clara evidência de atividade carcinogênica em machos (com base na ocorrência de sarcomas histiocíticos e adenomas alveolares/ bronquiolares) e alguma evidência de atividade carcinogênica em camundongos fêmeas (com base na ocorrência de adenomas alveolares/ bronquiolares), esses estudos são

considerados menos adequados para avaliação de resposta à dose do que os bioensaios de dois anos (Ref. 5) por razões que incluem a curta duração, o pequeno número de animais usados por grupo de tratamento e um entendimento limitado de como as relações de resposta à dose observadas em animais geneticamente modificados correspondem àqueles observados em bioensaios padrão de carcinogenicidade a longo prazo (Ref. 7).

Glicidol – Detalhes dos estudos de carcinogenicidade

Estudo	Grupo de dose/ Animais	Duração/ Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/sexo mais sensível do tumor	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 5*	50/sexo/ grupo Ratos F344/N	2 anos 5 dias/sem. Gavagem Oral	50	2: 26,5; 53,8 mg/kg/d	Glândula mamária/ Fêmea	4,15
Ref. 5	50/sexo/ grupo Camundongos B6C3F1	2 anos 5 dias/sem. Gavagem Oral	50	2: 17,7; 35,4 mg/kg/d	Glândula harderiana/ Fêmea	32,9
Ref. 8	12-20/ sexo/ grupo Hamsters Syrian Golden	60 semanas Duas vezes/sem. Gavagem	Sim	1: M: 15,8 F: 17,9 mg/kg/d	Baço/ Fêmea	56,1 [^]
Ref. 9 (*Citado em Ref. 2)	20 Camundongos ICR/Ha Swiss	520 dias 3 vezes/sem. Pintura de pele	Sim	1: 5%	Sem tumores	NA [^]

Os estudos listados estão no CPDB (Ref. 10), salvo indicação contrária.

* Estudo de carcinogenicidade selecionado para o cálculo da AI.

** Não no CPDB.

NA = Não aplicável.

[^]Não existe um desenho de carcinogenicidade. Apenas uma dose, dosagem intermitente e tamanho pequeno da amostra (Ref.7).

Modo de ação de carcinogenicidade

O glicidol é um carcinógeno mutagênico e a ingestão aceitável é calculada por extrapolação linear do TD₅₀.

Limites regulatórios e/ ou publicados

Nenhum limite regulatório foi publicado, por exemplo, pela EPA dos EUA, OMS ou ATSDR.

Ingestão aceitável (AI)

Fundamentação da seleção do estudo para o cálculo da AI

Os dados de carcinogenicidade mais adequados para avaliação da potência do câncer humano vêm dos estudos orais de dois anos conduzidos em ratos F344/N e camundongos B6C3F1 pelo NTP (Ref. 5). O local do órgão mais sensível foram as glândulas mamárias de fêmeas com um TD₅₀ de 4,15 mg/kg/dia.

Cálculo de AI

AI vitalícia = TD₅₀/50.000 x 50 kg

AI vitalícia = 4,15 (mg/kg/dia)/50.000 x 50 kg

AI vitalícia = 4 µg/dia

Referências

1. Bakhiya N, Abraham K, Gurtler R, Appel KE, Lampen A. Toxicological assessment of 3-chloropropane-1,2-diol and glycidol fatty acid esters in food. *Mol Nutr Food Res* 2011;55:509-21.
2. IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Geneva: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. [Online]. 1972-PRESENT. (Multivolume work). 2000; 77:469; Available from: URL: <http://monographs.iarc.fr/index.php>.
3. CCRIS. Chemical Carcinogenesis Research Information System. National Library of Medicine. [Online]. 2013. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?CCRIS> and search on CAS number.
4. Irwin RD, Eustis SL, Stefanski S, Haseman JK. Carcinogenicity of Glycidol in Rato F344s and B6C3F1 mice. *J Appl Toxicol* 1996;16 (3):201-9.
5. NTP. Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of glycidol (CAS No. 556-52-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. 1990. NTP TR 374.
6. NTP. Toxicology and Carcinogenesis Studies of Glycidol (CAS No. 556-52-5) in genetically modified haploinsufficient p16 (Ink4a)/p19 (Arf) mice (gavage study). *Natl Toxicol Program Genet Modif Model Rep* 2007;13:1-81.
7. California Environmental Protection Agency (CalEPA). No Significant Risk Level (NSRL) for the Proposition 65 carcinogen Glycidol. [Online]. 2010. Available from: URL: http://www.oehha.ca.gov/prop65/CRNR_notices/pdf_zip/GlycidolNSRL073010.pdf
8. Lijinsky W, Kovatch RM. A study of the carcinogenicity of glycidol in Syrian hamsters. *Toxicol Ind Health* 1992;8(5):267-71.

9. Van Duuren BL, Langseth L, Goldschmidt BM, Orris L. Carcinogenicity of epoxides, lactones, and peroxy compounds. VI. Structure and carcinogenic activity. *J Natl Cancer Inst* 1967;39:1217–28.
10. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>

Hidrazina (Nº CAS 302-01-2)

Potencial de exposição humana

A hidrazina é utilizada na síntese de produtos farmacêuticos, pesticidas e espumas plásticas (Ref. 1). O sulfato de hidrazina tem sido utilizado no tratamento da tuberculose, anemia falciforme e outras doenças crônicas (Ref. 2). Há informações limitadas sobre a ocorrência natural de hidrazina e derivados (Ref. 3). Os seres humanos podem ser expostos à hidrazina devido à contaminação ambiental da água, ar e solo (Ref. 1); no entanto, a principal fonte de exposição humana está no local de trabalho (Ref. 4). Pequenas quantidades de hidrazina também foram relatadas em produtos de tabaco e fumaça de cigarro (Ref. 1, 5).

Mutagenicidade/ genotoxicidade

A hidrazina é mutagênica e genotóxica *in vitro* e *in vivo*.

A IARC (Ref. 6) revisou a mutagenicidade da hidrazina. As principais observações estão resumidas aqui.

A hidrazina foi mutagênica em:

Ensaio de mutação microbiana reversa (Ames), linhagens de *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA 102, TA 98 e TA 100 e na linhagem de *Escherichia coli* WP2 *uvrA*, com e sem ativação;

Células L5178Y de linfoma de camundongos *in vitro*, nos genes *tk* e *hprt*.

In vivo, (Ref. 6) micronúcleos induzidos pela hidrazina, mas não aberrações cromossômicas na medula óssea de camundongos. Adutos de DNA foram relatados em vários tecidos *in vivo*.

Carcinogenicidade

A hidrazina é classificada pela IARC como Grupo 2B, ou possivelmente carcinogênica para humanos (Ref. 6) e pela EPA dos EUA como Grupo B2 ou provável carcinógeno humano (Ref. 7).

Existem sete estudos de carcinogenicidade da hidrazina citados no CPDB (Ref. 8): Três estudos de inalação que incluíram duração da dose em 1 ano, três estudos em água potável e um por gavagem oral. Cinco dos sete estudos de carcinogenicidade da hidrazina foram considerados positivos pelos autores dos relatórios originais.

Os principais órgãos-alvo da carcinogenicidade oral da hidrazina em roedores são o fígado e os pulmões. Estudos orais mais robustos, baseados no tamanho do grupo e nos níveis de dose, foram publicados nas Refs. 9 e 10. O estudo de inalação mais robusto com o menor TD₅₀ está na Ref. 11. Os alvos tumorais mais sensíveis à carcinogenicidade por inalação da hidrazina em roedores são locais de contato inicial, como a cavidade nasal e os pulmões.

Os estudos realizados sobre o sulfato de hidrazina no CPDB (Ref. 8) não são mostrados aqui, pois incluem <50 animais por grupo (e um nível de dose única em um caso), e os valores calculados de TD₅₀ foram mais altos (menos potentes) do que aqueles para o estudo da água potável da hidrazina (Ref. 9). Dada a semelhança entre os resultados dos dois estudos robustos sobre água potável (Ref. 9, 10), o estudo mais recente com as doses testadas mais elevadas (Ref. 10) foi selecionado para o cálculo da AI por não-inalação da hidrazina.

Hidrazina – Detalhes dos estudos de carcinogenicidade

Estudo	Grupo de dose/ Animais	Duração/ Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/ sexo mais sensível do tumor	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 9	50/sexo/ grupo Ratos Wistar	Vitalícia Água Potável	50	3: M: 0,1; 1,5, 2,5. F: 0,11, 0,57, 2,86 mg/kg/d	Fígado/ Fêmea	41,6
Ref. 11*	100/sexo/ grupo Ratos F344	1 ano com 18 meses de observação Inalação	150	4: M:1,37, 6,87, 27,5, 137 F: 1,96, 9,81, 39,3, 196 µg/kg/d	Pólipos adenomato- sos nasais/ Macho	0,194
Ref. 12	50/sexo/ grupo Bor: NMRI, Camundongos da linhagem SPF NMRI	2 anos Água potável	50	3: M: 0,33, 1,67, 8,33. F: 0,4, 2,0, 10,0 mg/kg/d	Negativo	NA, estudo negativo
Ref. 11	200 Hamsters machos Golden Syrian	1 ano com 12 meses de observação Inalação	Sim	3: 0,02, 0,08, 0,41 mg/kg/d	Pólipos adenomato- sos nasais/ Macho	4,16
Ref. 11	400 Camundongos Fêmeas C57BL/6 Mice	1 ano com 15 meses de observação Inalação	Sim	1: 0,18 mg/kg/d	Negativo	NA
Ref. 13	50/sexo/ grupo Camundongos Swiss	Vitalícia Água Potável	Não simultâneo	1: ~1,7-2 mg/kg/d	Pulmão/ Macho	2,20 [¥]
Ref. 14	25 Camundongos Swiss fêmeas	40 semanas 5d/sem. Gavagem	85 não tratados	1: ~5 mg/kg/d	Pulmão/ Fêmea	5,67 ^{¥¥}
Ref. 10 ^{**^}	50/sexo/ F344/ Ratos DuCrj	Vitalícia Água Potável	Sim	3: M: 0,97, 1,84, 3,86 F:1,28, 2,50, 5,35 mg/kg/d	Fígado/ Fêmea	38,7
Ref. 10 [^]	50/sexo Camundongos Crj:BDF1	Vitalícia Água Potável		3: M: 1,44, 2,65, 4,93 F: 3,54, 6,80, 11,45 mg/kg/d	Fígado/ Fêmea	52,4

Os estudos listados estão no CPDB (Ref. 8).

* Estudo de carcinogenicidade selecionado para o cálculo da AI por inalação.

** Estudo de carcinogenicidade selecionado para TD₅₀ não inalado (vide Nota 2) e cálculos de AI.

NA = Não aplicável.

‡ Excluído pela EPA dos EUA (Ref. 7); sem controles simultâneos. Fígado negativo.

‡‡ Sobrevivência animal afetada. Fígado negativo.

^ Não no CPDB

Modo de ação de carcinogenicidade

Não definido. Os adutos de DNA foram detectados *in vivo* (Ref. 15, 16, 17, 18, 19, 20), embora sejam relatados em tecidos que não desenvolvem tumores, portanto, sua contribuição para a tumorigenicidade não é conhecida.

Limites regulatórios e/ ou publicados

A EPA dos EUA (Ref. 7) publicou um fator de inclinação oral de 3,0 por mg/kg/dia e um risco de unidade de água potável de $8,5 \times 10^{-5}$ por $\mu\text{g/L}$. No nível de risco de 1 em 100.000, isso equivale a uma concentração de 0,1 μg de hidrazina/L de água ou $\sim 0,2 \mu\text{g/dia}$ para 50 kg/humano. Esse limite é uma extrapolação linearizada de vários estágios, com base na observação de hepatomas em um estudo de gavagem de múltiplas doses (Ref. 21), em que o sulfato de hidrazina foi administrado a camundongos por 25 semanas, seguido de observação ao longo da vida (Ref. 7). Foram identificados estudos adicionais publicados após o cálculo do fator de inclinação oral (Ref. 9, 10, 17, 22). Esses estudos podem potencialmente produzir uma alteração no fator de inclinação oral, mas ainda não foram reavaliados pela EPA dos EUA

A EPA dos EUA (Ref. 7) também publicou um fator de inclinação de inalação de 17 por mg/kg/dia e um risco de unidade de inalação de $4,9 \times 10^{-3}$ por $\mu\text{g/m}^3$. No nível de risco de 1 em 100.000, isso equivale a uma concentração de ar de $2 \times 10^{-3} \mu\text{g/m}^3$ de hidrazina ou 0,04 $\mu\text{g/dia}$, pressupondo que uma pessoa respire 20 m^3/dia . Esse limite é uma extrapolação linearizada de vários estágios, com base na observação de adenoma da cavidade nasal ou adenocarcinoma em ratos machos em um estudo de inalação de doses múltiplas, em que a hidrazina foi administrada 6 horas/dia, 5 dias/semana por 1 ano, seguida por um período de observação de 18 meses (citado na Ref. 7). Somente a análise desses dados pela EPA dos EUA estava acessível; no entanto, os resultados parecem ser muito semelhantes aos de Vernot *et al.* (Ref. 11), se não forem os mesmos.

Ingestão aceitável (AI)

Fundamentação da seleção do estudo para o cálculo da AI

Os estudos de carcinogenicidade oral e por inalação para hidrazina foram revistos para determinar se é necessário um limite separado específico para a carcinogenicidade por inalação. Dada a carcinogenicidade mais potente específica para o primeiro local de contato observado nos estudos de inalação, determinou-se que era apropriada uma AI separada para exposição por inalação.

Para a hidrazina oral, a carcinogenicidade foi relatada em 4 estudos com camundongos e 2 estudos com ratos. O efeito mais sensível nos estudos orais foi baseado em adenomas hepatocelulares e carcinomas do fígado em ratos fêmeas (Ref. 10).

Todos os estudos de carcinogenicidade por inalação que foram usados pela EPA dos EUA na derivação do limite de carcinogenicidade por inalação para hidrazina foram levados em consideração ao selecionar o estudo de carcinogenicidade mais robusto para a derivação de uma AI para produtos farmacêuticos inalados. O estudo crítico de MacEwen *et al.* utilizado pela EPA dos EUA (Ref. 7) era de propriedade da empresa, mas provavelmente é o mesmo descrito em Vernot *et al.* (Ref. 11). Dado que o TTC foi derivado por extrapolação linear dos valores de TD₅₀ para centenas de agentes carcinogênicos, essa mesma abordagem foi usada na derivação de uma AI específica de composto para hidrazina. A metodologia usada pela EPA dos EUA e o método usado aqui são de natureza altamente conservadora. No entanto, dado que as metodologias diferem, é razoável esperar algumas pequenas diferenças. A AI foi calculada com base no TD₅₀ derivado de um estudo no qual ratos machos e fêmeas receberam hidrazina por inalação por um ano, com um período de observação de 18 meses (Ref. 11). Embora um estudo de 1 ano não seja um desenho padrão para carcinogenicidade, uma resposta positiva foi observada demonstrando que a janela para carcinogenicidade não foi perdida. O tecido alvo mais sensível foi a região nasal de machos, com um valor de TD₅₀ de 0,194 mg/kg/dia, após ser ajustado, como prática padrão, para contabilizar 1 vs 2 anos de exposição.

Cálculo de AI

$$\text{AI vitalícia} = \text{TD}_{50}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 38,7 \text{ (mg/kg/dia)}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 39 \text{ }\mu\text{g/dia}$$

Cálculo de AI por inalação

$$\text{AI vitalícia} = \text{TD}_{50}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{AI vitalícia} = 0,194 \text{ (mg/kg/dia)}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$\text{Inalação AI vitalícia} = 0,2 \text{ }\mu\text{g/dia}$$

Referências

1. Choudary G, Hansen H. Human health perspective on environmental exposure to hydrazines: A review. *Chemosphere* 1998;37:801-43.
2. Von Burg R, Stout T. Hydrazine. *J Appl Toxicol* 1991;11:447-50.
3. Toth B. A review of the natural occurrence, synthetic production and use of carcinogenic hydrazines and related chemicals. *In vivo*. 2000;14(2):299-319.
4. Hazardous Substance Database (HSDB): Hydrazine (302-01-2); [Online]. 2005 June 24 [cited 2013 February 27]; Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/>
5. Liu YY, Schmeltz I, Hoffman D. Chemical studies on tobacco smoke. Quantitative analysis of hydrazine in tobacco and cigarette smoke. *Anal Chem* 1974;46: 885-9.
6. IARC. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Geneva. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, [Online] 1972-PRESENT. (Multivolume work). 1999; Available from: URL: <http://monographs.iarc.fr/index.php> p. V71 1006.
7. US Environmental Protection Agency. Hydrazine/Hydrazine sulfate (302-01-2). Integrated Risk Information System (IRIS). [Online]. 1991. Available from: URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0352_summary.pdf
8. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
9. Steinhoff D, Mohr U. The question of carcinogenic effects of hydrazine. *Exp Pathol* 1988;33:133-40.
10. Matsumoto M, Kano H, Suzuki M, Katagiri T, Umeda Y, Fukushima S. Carcinogenicity and chronic toxicity of hydrazine monohydrate in rats and mice by two-year água potável treatment. *Regul Toxicol Pharmacol* 2016;76:63-73.
11. Vernot EH, MacEwen JD, Bruner RH, Haun CC, Kinkead ER, Prentice DE, *et al.* Long- term inhalation toxicity of hydrazine. *Fundam Appl Toxicol* 1985;5:1050-64.
12. Steinhoff D, Mohr U, Schmidt WM. On the question of the carcinogenic action of hydrazine - evaluation on the basis of new experimental results. *Exp Pathol* 1990;39:1-9.
13. Toth B. Hydrazine, methylhydrazine and methylhydrazine sulfate carcinogenesis in Swiss mice. Failure of ammonium hydroxide to interfere in the development of tumors. *Int J Cancer* 1972;9:109-18.
14. Roe FJC, Grant GA, Millican DM. Carcinogenicity of hydrazine and 1,1- dimethylhydrazine for camundongo lung. *Nature* 1967;16:375-6.

15. Becker RA, Barrows LR, Shank RC. Methylation of liver DNA guanine in hydrazine hepatotoxicity: dose-response and kinetic characteristics of 7-methylguanine and O6-methylguanine formation and persistence in rats. *Carcinogenesis* 1981;2:1181-8.
16. Bosan WS, Shank RC. Methylation of liver DNA guanine in hamsters given hydrazine. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983;70:324-34.
17. Bosan WS, Shank RC, MacEwen JD, Gaworski CL, Newberne PM. Methylation of DNA guanine during the course of induction of liver cancer in hamsters by hydrazine or dimethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 1987;8:439-44.
18. Saffhill R, Fida S, Bromley M, O'Connor PJ. Promutagenic alkyl lesions are induced in the tissue DNA of animals treated with isoniazid. *Human Toxicol* 1988;7:311-7.
19. Leakakos T, Shank RC. Hydrazine genotoxicity in the neonatal rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;126:295-300.
20. Mathison B, Murphy SE, Shank RC. Hydralazine and other hydrazine derivatives and the formation of DNA adducts. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;127:91-8.
21. Biancifiori, C. Hepatomas in CBA/Cb/Se mice and liver lesions in golden hamsters induced by hydrazine sulfate. *J Natl Cancer Inst* 1970;44:943.
22. FitzGerald BE, Shank RC. Methylation status of DNA cytosine during the course of induction of liver cancer in hamsters by hydrazine sulphate. *Carcinogenesis* 1996;17:2703-9.

Peróxido de hidrogênio (Nº CAS 7722-84-1)

Potencial de exposição humana

O peróxido de hidrogênio pode estar presente no chá verde e no café instantâneo, em frutas e vegetais frescos e produzido naturalmente no corpo (Ref. 1). Estima-se que até 6,8 g sejam produzidos endogenamente por dia (Ref. 2). Outras fontes comuns de exposição são desinfetantes, alguns produtos tópicos em creme para acne e produtos para higiene bucal que podem conter até 4% de peróxido de hidrogênio (Ref. 2).

Mutagenicidade/ genotoxicidade

O peróxido de hidrogênio é mutagênico e genotóxico *in vitro*, mas não *in vivo*.

A IARC (Ref. 3) e o Centro Comum de Pesquisa da Comissão Europeia (Ref. 4) revisaram os dados de mutagenicidade para o peróxido de hidrogênio, e as principais observações são resumidas aqui.

O peróxido de hidrogênio é mutagênico em:

Linhagens de *Salmonella typhimurium* TA96, TA97, SB1106p, SB1106 e SB1111 e *Escherichia coli* WP2 na ausência de ativação metabólica exógena;

Células de linfoma de camundongo L5178Y sublinham no locus *hprt*;

Células V79 de hamster chinês no locus *hprt*, em apenas um dos seis estudos.

In vivo, os micronúcleos não foram induzidos após a administração de peróxido de hidrogênio a camundongos intraperitonealmente até 1.000 mg/kg, ou a camundongos C57BL/6NCr1BR com deficiência de catalase na água potável a 200, 1.000, 3.000 e 6.000 ppm por duas semanas.

Carcinogenicidade

O peróxido de hidrogênio é classificado pela IARC como Grupo 3, não classificável quanto à sua carcinogenicidade para seres humanos (Ref. 3).

Há apenas um relatório de carcinogenicidade (Ref. 5) citado no CPDB (Ref. 6), no qual os camundongos foram tratados com peróxido de hidrogênio na água potável a 0,1 ou 0,4% por aproximadamente 2 anos. O estudo incluiu dois grupos de tratamento e cerca de 50 animais por grupo de dose. Aumentos estatisticamente significativos nos tumores do duodeno ($p < 0,005$) foram observados em ambos os grupos de doses no estudo de carcinogenicidade em camundongos (Ref. 5), embora apenas os tumores duodenais com alta dose em fêmeas sejam notados como significativos no CPDB (Ref. 6). Assim, 0,1% de peróxido de hidrogênio administrado na água potável foi definido como o Nível de Efeito Adverso Mais Baixo Observado (LOAEL), equivalente a uma taxa de dose diária média por kg de peso corporal por dia de 167 mg/kg/dia.

Os estudos com duração de 6 meses ou mais estão resumidos na tabela a seguir (adaptada da Ref. 2); eles são limitados no número de animais e usaram um nível de dose única. A maioria dos estudos não atendeu aos critérios de inclusão com um cálculo de TD_{50} no CPDB. DeSesso *et al.* (Ref. 2) observaram que, de 14 estudos de carcinogenicidade (2 estudos subcutâneos em camundongos, 2 estudos dérmicos em camundongos, 6 estudos de água potável [2 em ratos e 4 em camundongos], 1 estudo de intubação oral em hamsters, e 3 estudos em bolsa bucal), apenas 3 estudos com água potável em camundongos (Ref. 5, 8, 9) demonstraram aumentos nos tumores (do duodeno proximal) com peróxido de hidrogênio. Esses estudos com camundongos foram cuidadosamente avaliados pelo

Comitê de Avaliação do Câncer [*Cancer Assessment Committee*] (CAC) da FDA dos EUA (Ref. 10). A conclusão foi que os estudos não forneceram evidências suficientes de que o peróxido de hidrogênio seja um agente carcinogênico (Ref. 10).

Na Europa, o Comitê Científico de Produtos de Consumo revisou os dados disponíveis para o peróxido de hidrogênio e concluiu que o peróxido de hidrogênio não atendia à definição de mutagênico (Ref. 11). Eles também declararam que o fraco potencial de efeitos carcinogênicos locais tem um modo de ação pouco claro, mas um mecanismo genotóxico não pôde ser excluído (Ref. 11). Por outro lado, DeSesso *et al.* (Ref. 2) sugeriram que o peróxido de hidrogênio diluído decompor-se-ia antes de atingir o local alvo (duodeno) e que as lesões hiperplásicas vistas eram devidas à irritação dos grãos de comida, acompanhando uma diminuição no consumo de água, o que é frequentemente observado com exposição ao peróxido de hidrogênio na água potável. A falta de efeito direto é sustentada pela falta de tumores nos tecidos expostos diretamente via água potável (boca, esôfago e estômago), e pelo fato de que em estudos de até 6 meses no hamster (Ref. 14), em que o peróxido de hidrogênio foi administrado por intubação gástrica (o consumo de água não foi afetado), o estômago e os epitélios duodenais pareciam normais; essa foi a base para a conclusão da FDA dos EUA, citada acima (Ref. 10).

Peróxido de hidrogênio – Detalhes dos estudos de carcinogenicidade oral

Estudo	Grupo de dose/ Animais	Duração/ Exposição	Controles	Doses	Notas
Ref. 5*	48-51/sexo/grupo Camundongos C57BL/6J	100 semanas Água potável	Sim	2: 0,1; 0,4% M: 167; 667 F: 200; 800 mg/kg/d	TD ₅₀ 7,54 g/kg/d para carcinoma duodenal feminino
Ref. 7	Total de 29 camundongos C57BL/6J machos e fêmeas (grupos adicionais amostrados em intervalos de 7 a 630 dias de tratamento; ou 10 a 30 dias após a interrupção do tratamento aos 140 dias)	700 dias Água potável	No	1: 0,4%	Nenhum tumor relatado. Indução dependente do tempo de erosões e nódulos no estômago e nódulos e placas no duodeno. Após um período de recuperação após 140 dias de tratamento com H ₂ O ₂ , por 10 a 30 dias sem tratamento, houve menos camundongos com lesões.
Ref. 8	Total de 18 camundongos C3H/HeN machos e fêmeas	6 meses Água potável	No	1: 0,4%	2 camundongos com tumores duodenais (11,1%)
Ref. 8	Total de 22 camundongos B6C3F1 machos e fêmeas	6 meses Água potável	No	1: 0,4%	7 camundongos com tumores duodenais (31,8%)
Ref. 8	Total de 21 camundongos C57BL/6N ^ε machos e fêmeas	7 meses Água potável	No	1: 0,4%	21 camundongos com tumores duodenais (100%)

Ref. 8	Total de 24 camundongos C3H/Cb/s ^ε machos e fêmeas	6 meses Água potável	No	somente 0,4%	22 camundongos com tumores duodenais (91,7%)
Ref. 9	21 camundongos C3H/HeN fêmeas	6 meses Água potável	11	1: 0,4%	2 camundongos com tumores duodenais (9,5%). Nenhum nos controles
Ref. 9	22 camundongos B6C3F1 fêmeas	6 meses Água potável	12	1: 0,4%	7 camundongos com tumores duodenais (31,8%) Nenhum nos controles
Ref. 9	24 camundongos C3H/Cb/s ^ε fêmeas	6 meses Água potável	28	1: 0,4%	22 camundongos com tumores duodenais (91,7%). Nenhum nos controles
Ref. 12	3 ratos machos	21 semanas Água potável	3	1: 1,5%	Não foi observado efeito tumorigênico
Ref. 13	Ratos machos e fêmeas (50/sexo/grupo)	2 anos Água potável	Sim	2: 0,3% 0,6%	Não foi observado efeito tumorigênico
Ref. 14	Hamsters, sexo não informado (20/grupo)	15 semanas e 6 meses Gavagem Oral (5 d/sem.)	Sim	1: 70 mg/kg/d	Não foi observado efeito tumorigênico

* Estudo de carcinogenicidade selecionado para o cálculo da EDP; no CPDB (Ref. 6).

Todos os outros estudos não estão no CPDB, mas estão resumidos na Ref. 2

^ε Deficiente em catalase

Modo de ação para carcinogenicidade

O peróxido de hidrogênio é uma das espécies reativas de oxigênio (ERO) que é formada como parte do metabolismo celular normal (Ref. 4). A toxicidade do peróxido de hidrogênio é atribuída à produção da ERO e subsequente dano oxidativo, resultando em citotoxicidade, quebras na cadeia de DNA e genotoxicidade (Ref. 15). Devido à inevitável produção endógena da ERO, o corpo desenvolveu mecanismos de defesa para limitar seus níveis, envolvendo catalase, superóxido dismutases e glutathione peroxidase.

O estresse oxidativo ocorre quando os mecanismos naturais de defesa antioxidante do corpo são excedidos, causando danos às macromoléculas, como DNA, proteínas e lipídios. As ERO também inativam as enzimas antioxidantes, aumentando ainda mais seus efeitos prejudiciais (Ref. 16). Durante a respiração mitocondrial, o oxigênio passa por uma transferência única de elétrons, gerando o radical ânion superóxido. Essa molécula mostra reatividade limitada, mas é convertida em peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio é então reduzido a água e oxigênio pela catalase e glutathione peroxidase (Ref. 17). No entanto, na presença de metais de transição, como ferro e cobre, o peróxido de hidrogênio é reduzido ainda mais para radicais hidroxila extremamente reativos. São tão reativos que não difundem mais de um ou dois diâmetros moleculares antes de reagir com um componente celular (Ref. 16). Portanto, eles devem ser gerados imediatamente adjacentes ao DNA para oxidá-lo. Os antioxidantes fornecem uma fonte de elétrons que reduzem os radicais hidroxila de volta à água, diminuindo sua reatividade. Claramente, antioxidantes e outras defesas celulares que protegem contra danos oxidativos são limitados dentro de um sistema de teste *in vitro*. Conseqüentemente, após o tratamento com peróxido de hidrogênio, esses mecanismos de

proteção são prontamente sobrecarregados, induzindo citotoxicidade e genotoxicidade em linhas celulares bacterianas e de mamíferos. A diminuição da resposta *in vitro* foi demonstrada pela introdução de elementos dos mecanismos de proteção que operam no corpo; por exemplo, introdução de enzimas degradantes do peróxido de hidrogênio, como catalase ou ajuste do nível de metais de transição (Ref. 11). Não é surpreendente que, *in vivo*, onde os mecanismos de defesa celular estão intactos, o peróxido de hidrogênio não seja genotóxico após exposição a curto prazo. Isso sugere que existe um limiar abaixo do qual os mecanismos de defesa celular podem regular a ERO, mantendo a homeostase.

Com base na abrangente avaliação de risco da Comissão Europeia (CE, Ref. 4), o peso da evidência sugere que o peróxido de hidrogênio é mutagênico *in vitro* quando os mecanismos de proteção são sobrecarregados. No entanto, não é genotóxico em estudos padrão *in vivo*. Seu modo de ação tem um efeito limiar não linear.

Limites regulatórios e/ ou publicados

O anexo III do Regulamento Cosmético Europeu [*European Cosmetic Regulation*] (Ref. 18) forneceu níveis aceitáveis de peróxido de hidrogênio em produtos de higiene bucal e clareamento dental. Para produtos orais vendidos sem receita, incluindo produtos para enxágue bucal, creme dental e branqueadores, as concentrações máximas de peróxido de hidrogênio permitidas (presentes ou liberadas) são de 0,1%. Níveis mais altos, até 6%, também são permitidos, desde que os dentistas prescrevam produtos para maiores de 18 anos. O SCCP da CE (Ref. 11) estimou que 3 g de enxaguatório bucal ou 0,48 g de creme dental poderiam ser ingeridos por dia. Com 0,1% de peróxido de hidrogênio no produto, a quantidade de peróxido de hidrogênio potencialmente ingerida seria 3 mg de enxaguatório bucal ou 0,48 mg de creme dental. Esses valores podem superestimar a ingestão, pois é provável que a maior parte do peróxido de hidrogênio seja decomposta durante o uso de produtos de higiene bucal e não seja ingerida (Ref. 4).

FDA dos EUA – Peróxido de hidrogênio é Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) até 3% para uso a longo prazo sem receita como um agente antigengivite/ antiplaca (Ref. 19).

Exposição diária permitida (EDP)

O peróxido de hidrogênio é genotóxico por meio de um modo de ação com um limiar (isto é, estresse oxidativo) e é produzido endogenamente no corpo em altos níveis que excedem os níveis encontrados em produtos de higiene bucal e outros produtos de higiene pessoal. Portanto, não foi considerado apropriado derivar uma EDP com base em dados de carcinogenicidade. Mesmo uma ingestão de 1% da produção endógena estimada de 6,8 g/dia, ou seja, 68 mg/dia (ou 68.000 µg/dia) não aumentaria significativamente a exposição histórica, mas normalmente excederia os limites com base na qualidade em um produto farmacêutico. O guia M7 do ICH observa que, ao calcular ingestões aceitáveis a partir de avaliações de risco específicas de compostos, um limite superior seria determinado por um limite de qualidade de 0,5% ou, por exemplo, 500 µg em um medicamento com uma dose diária máxima de 100 mg.

Referências

1. Halliwell B, Clement MV, Long LH. Hydrogen peroxide in the human body. *FEBS Lett* 2000;486:10-13.

2. DeSesso JM, Lavin AL, Hsia SM, Mavis RD. Assessment of the carcinogenicity associated with oral exposures to hydrogen peroxide. *Food and Chem Toxicol* 2000;38:1021-41.
3. IARC. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1999 Vol. 71.
4. European Commission Joint Research Center. EU Risk Assessment report. Hydrogen Peroxide. CASRN 7722-84-1). 38. [Online]2003. Available from: URL: <https://echa.europa.eu/documents/10162/a6f76a0e-fe32-4121-9d9d-b06d9d5f6852>
5. Ito A, Watanabe H, Naito M, Naito Y. Induction of duodenal tumors in mice by oral administration of hydrogen peroxide. *Gann the Japanese Journal of Cancer Research* 1981;72: 174-5.
6. Carcinogenicity Potency Database (CPDB). [Online]. Available from: URL: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cpdb/>
7. Ito A, Naito M, Naito Y, Watanabe H. Induction and characterization of gastro-duodenal lesions in mice given continuous oral administration of hydrogen peroxide. *Gann the Japanese Journal of Cancer Research* 1982;73: 315-322.
8. Ito A, Watanabe H, Naito M, Naito Y, Kawashima K. Correlation between induction of duodenal tumor by hydrogen peroxide and catalase activity in mice. *Gann the Japanese Journal of Cancer Research* 1984;75: 17-21.
9. Ito A, Watanabe H, Aoyama H, Nakagawa Y, Mori M. Effect of 1,2-dimethylhydrazine and hydrogen peroxide for the duodenal tumorigenesis in relation to blood catalase activity in mice. *Hiroshima Journal of Medical Science* 1986;35:197-200.
10. FDA dos EE.UU.. Irradiation in the production, processing, and handling of food. *Food and Drug Administration. Federal Register* 1988; Vol. 53, No. 251:53198-9.
11. SCCP. European Commission. Scientific Committee on Consumer Products. Opinion on Hydrogen peroxide, in its free form or when released, in oral hygiene products and tooth whitening products. SCCP/1129/07 [Online] 2007. Available from: URL: https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_122.pdf
12. Hiroto N. and Yokoyama T. Enhancing effect of hydrogen peroxide upon duodenal and upper jejunal carcinogenesis in rats. *Gann* 1981; 72: 811-812. Cited in Ref. 2.
13. Ishikawa T. and Takayama S. (1984) Hydrogen peroxide. In *Information Bulletin on the Survey of Chemicals being Tested for Carcinogenicity*. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 1984; 11:86. (Cited in Ref. 2).

14. Li Y, Noblitt T, Zhang A, Origel A, Kafrawy A, Stookey G. Effect of long-term exposure to a tooth whitener [Abstract]. *Journal of Dental Research* 1993;72:1162. (Cited in Ref. 2).
15. Tredwin CJ, Naik S, Lewis NJ, Scully C. Hydrogen peroxide tooth-whitening (bleaching) products: Review of adverse effects and safety issues. *British Dental Journal* 2006;200:371-6.
16. De Bont R, Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 2004;19:169-85.
17. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408:239-47.
18. Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council of 30 November 2009 on cosmetic products.
19. FDA dos EE.UU.. Oral health care drug products for over-the-counter human use; antigingivitis/antiplaque drug products; establishment of a monograph. *Federal Register* 2003; 68:32232-86.

Cloreto de Metila (Clorometano, N° CAS 74-87-3)

Potencial de exposição humana

Baixos níveis de cloreto de metila ocorrem no ambiente, uma vez que milhares de toneladas de cloreto de metila são produzidas naturalmente todos os dias, por exemplo, pelo fitoplâncton marinho, por fermentação microbiana e por incêndios de biomassa (queimadas em pradarias e incêndios florestais) e vulcões, excedendo em muito a liberação por atividades humanas.

A OMS (Ref. 1) relata que a concentração de cloreto de metila no ar em locais rurais é geralmente inferior a $2,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (1,0 ppb), enquanto nas cidades urbanas é igual a 0,27 a $35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (0,13 a 17 ppb), correspondendo a aproximadamente 20-700 μg de ingestão diária (volume respiratório humano de 20 m^3 por dia). É relatada uma ampla gama de concentrações em rios, água do oceano, água subterrânea e água potável, com o nível máximo de água potável relatado em 44 $\mu\text{g}/\text{L}$ em uma amostra de poço (Ref. 1).

Mutagenicidade/ Genotoxicidade

O cloreto de metila é mutagênico e genotóxico *in vitro*, mas equívoco *in vivo*. A OMS (Ref. 1) e a EPA dos EUA (Ref. 2) revisaram os dados de mutagenicidade para o cloreto de metila; as principais observações estão resumidas aqui.

O cloreto de metila é mutagênico em:

Ensaio de mutação microbiana reversa (Ames), *Salmonella typhimurium* TA100, TA1535 e em *Escherichia coli* WP2uvrA, tanto na presença quanto na ausência de ativação metabólica; Linfoblastos humanos TK6.

In vivo, a OMS (Ref. 1) concluiu que "embora os dados de estudos padrão de genotoxicidade *in vivo* não estejam disponíveis, o cloreto de metila pode ser considerado um mutagênico muito fraco *in vivo* com base em algumas evidências de reticulação de proteína de DNA em doses mais elevadas".

Carcinogenicidade

O cloreto de metila é classificado pela IARC como Grupo 3: "Evidência inadequada para a carcinogenicidade para humanos" (Ref. 3), e pela EPA dos EUA como um composto de Categoria D não classificável quanto à carcinogenicidade humana (Ref. 2).

Em animais, a única evidência de carcinogenicidade vem de um único bioensaio de 2 anos que usou a via de administração por inalação em ratos e camundongos (Ref. 4). Foi observada uma incidência aumentada estatisticamente significativa de tumores renais benignos e malignos apenas em camundongos B6C3F1 machos na alta concentração (1.000 ppm). Embora não tenha significância estatística, o adenoma cortical também foi observado a 464 mg/m^3 (225 ppm), e o desenvolvimento de microcistos renais corticais em camundongos foi observado no grupo de doses de 103 mg/m^3 (50 ppm) e, em certa medida, no grupo de 464 mg/m^3 (225 ppm) (Ref. 4). No entanto, nenhuma relação de resposta à concentração pôde ser estabelecida. Hiperplasia tubuloepitelial cortical renal e cariomegalia também ficaram confinadas ao grupo de 1.000 ppm de camundongos machos. Não foram encontradas neoplasias em concentrações mais baixas ou em qualquer outro local no camundongo macho, ou em qualquer local ou concentração em camundongos fêmeas ou ratos F-344 de ambos os sexos. Foi demonstrado que os adenocarcinomas renais ocorrem apenas em camundongos machos em um nível de exposição improvável de ser encontrado pelas pessoas.

É provável que esses tumores renais do camundongo macho não sejam relevantes para os seres humanos. O cloreto de metila é metabolizado pela conjugação da glutatona e, em menor grau, pela oxidação do p450 (Ref. 1, 2). Pensa-se que os tumores renais em camundongos machos estejam relacionados à produção de formaldeído durante o metabolismo do cloreto de metila. A isozima do citocromo P-450 (CYP) que se acredita ser responsável, CYP2E1, está presente no rim de camundongo macho e é dependente de androgênio; camundongos fêmeas apresentaram níveis de CYP2E1 apenas 20-25% dos machos. A geração de formaldeído foi demonstrada em microssomas renais de camundongos CD-1 machos que excedem o de camundongos fêmeas ingênuas (não tratadas com androgênio), enquanto os microssomas renais do rato não geraram formaldeído. Além disso, as diferenças metabólicas específicas da espécie na maneira como o rim processa o cloreto de metila sugerem fortemente que as neoplasias renais do camundongo via oxidação do P-450 não são biologicamente relevantes para os seres humanos, uma vez que o rim humano carece da enzima chave (CYP2E1) conhecida por converter o cloreto de metila em intermediários tóxicos possuindo potencial carcinogênico. No rato, a atividade renal do CYP2E1 foi muito baixa. Nenhuma atividade de CYP2E1 foi detectada em amostras microssomais de rim humano (Ref. 2), nem foi detectada em células tubulares proximais isoladas recentemente do rim humano. O CYP4A11 foi detectado no rim humano, mas sua capacidade de metabolizar o cloreto de metila é desconhecida. Além do CYP4A11, as únicas outras enzimas P-450 encontradas em níveis significativos nos microssomas renais humanos são CYP4F2 e CYP3A. Ademais, nenhum produto químico ambiental comumente conhecido parece ser metabolizado pela família CYP4A. A falta de proteína CYP2E1 detectável no rim humano (em contraste com os camundongos, que têm altos níveis) sugere que o metabolismo do cloreto de metila por P450 (presumivelmente levando a concentrações elevadas de formaldeído), que é provavelmente responsável pela indução de tumores renais em camundongos machos, provavelmente não seja relevante para os seres humanos.

No entanto, conforme destacado pela EPA dos EUA (Ref. 2) e pela OMS (Ref. 1), não pode ser descartado o papel do metabolismo hepático (e/ ou renal) (levando a potenciais metabólitos genotóxicos) através da via dependente da glutatona (GSH) predominante (o metabolismo do cloreto de metila para formato no fígado é dependente da GSH, por meio do formaldeído desidrogenase que requer a GSH que oxida o formaldeído em formato) ou mesmo pelas isozimas P450 que não o CYP2E1 a esse respeito. No entanto, a produção de formaldeído por meio de doses baixas de cloreto de metila seria desprezível em comparação com a formação basal de formaldeído no corpo (ou seja, 878–1310 mg/kg/dia; Ref. 5). Além disso, com base nas limitações de relevância humana, a EPA dos EUA classificou o cloreto de metila como um composto do grupo D, que é "Não classificável quanto à carcinogenicidade humana".

Cloreto de Metila – Detalhes dos estudos de carcinogenicidade (apenas estudos de inalação disponíveis)

Estudo	Grupo de dose/ Animais	Duração/ Exposição	Controles	Doses	Local/tipo/sexo mais sensível do tumor	TD ₅₀ (mg/kg/d)
Ref. 4 (resumido na Ref. 1 e Ref. 2) *	120/sexo/ grupo Camundongos B6C3F1	24 meses 6h/d, 5d/sem. Inalação	Sim	3: 103; 464; 2064 mg/m ³ (50; 225; 1000 ppm)	Tumores renais apenas em machos. Nenhuma descoberta em fêmeas.	1.360,7**
Ref. 4 (resumido na Ref. 1 e Ref. 2)	120/sexo/ grupo Ratos Fisher 344	24 meses 6h/d, 5d/sem. Inalação	Sim	3: 103; 464; 2064 mg/m ³ (50; 225; 1000 ppm)	Não foram encontradas descobertas em machos ou fêmeas	NA

Nota: Estudos não listados no CPDB.

* Estudo de carcinogenicidade selecionado para o cálculo da AI.

** TD₅₀ calculado com base em dados de carcinogenicidade (ver Nota 3).

NA = Não aplicável

Limites regulatórios e/ ou publicados

A OMS (Ref. 1) desenvolveu um valor de referência para a população geral de 0,018 mg/m³ e a EPA dos EUA (Ref. 2) desenvolveu uma concentração de referência de 0,09 mg/m³. Ambos foram baseados no potencial de efeitos adversos no SNC após a inalação de cloreto de metila.

Ingestão aceitável (AI)

Embora os dados indiquem que os tumores observados em camundongos machos provavelmente não sejam relevantes para os seres humanos, uma AI foi desenvolvida devido às incertezas nos dados.

$$AI \text{ vitalícia} = TD_{50}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$AI \text{ vitalícia} = 1.360,7 \text{ mg/kg/dia}/50.000 \times 50 \text{ kg}$$

$$AI \text{ vitalícia} = 1.361 \text{ } \mu\text{g/dia}$$

Referências

1. World Health Organization (WHO). Concise International Chemical Assessment Document (CICAD) 28. Methyl chloride. [Online]. 2000; Available from: URL: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad28.htm>
2. US EPA. Methyl chloride. (CAS No. 74-87-3). Integrated Risk Information System (IRIS). [Online]. 2001; Available from: URL: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/toxreviews/1003tr.pdf
3. IARC. Methyl Chloride. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization, Lyon. 1999 Vol. 71.
4. CIIT. Final report on a chronic inhalation toxicology study in rats and mice exposed to methyl chloride. Report prepared by Battelle Columbus Laboratories for the CIIT. 1981 EPA/OTS Doc #878212061, NTIS/OTS0205952.
5. EFSA. European Food Safety Authority. Endogenous formaldehyde turnover in humans compared with exogenous contribution from food sources. EFSA Journal 2014; 12 Suppl 2:3550.

Nota 1

O TD₅₀ calculado para 1-cloro-4-nitrobenzeno é ilustrado abaixo, uma vez que não estava listado no CPDB. Os cálculos do 1-cloro-4-nitrobenzeno foram baseados no tipo de tumor mais sensível: feocromocitoma de rato fêmea (Ref. 1). As doses e incidências estão listadas abaixo.

ppm	Dose (mg/kg/dia)	Número de Animais Positivos	Número total de animais
0	0	3	50
50	1,9	6	50
225	9,8	4	50
1000	53,8	16	50

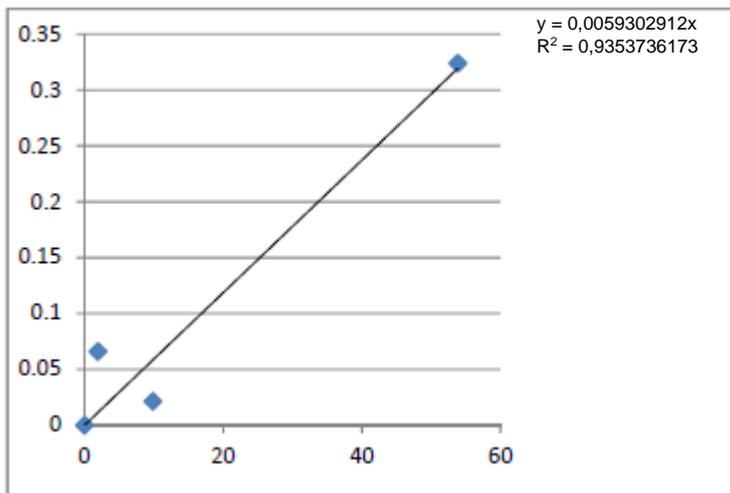
O TD₅₀ é calculado a partir de dados resumidos brutos da incidência de tumores em relação ao histórico, com a seguinte equação (Ref. 2, 3):

$$\frac{P - P_0}{1 - P_0} = 1 - \exp(-\beta \cdot D)$$

Onde P é a proporção de animais com o tipo de tumor especificado observado em uma determinada dose (D na equação) e P₀ é a proporção de animais com o tipo de tumor especificado para o controle. A conversão de β e D em uma equação linear simples resulta no seguinte:

$$\ln\left(-\left[\frac{P - P_0}{1 - P_0} - 1\right]\right) = \beta \cdot D$$

Traçando os resultados e usando a inclinação para representar os resultados de β no gráfico a seguir para a resposta à dose e $\beta = 0,0059302912$.



O TD_{50} pode então ser calculado da seguinte forma.

$$0,5 = 1 - \exp(-\beta \cdot TD_{50})$$

A resolução do TD_{50} resulta na seguinte equação.

$$TD_{50} = \frac{0.693}{\beta}$$

Portanto, o $TD_{50} = 0,693/0,0059302912$ ou 116,9 mg/kg/dia.

Referências

1. Matsumoto M., Aiso S, Senoh H, Yamazaki K, Arito H, Nagano K, *et al.* Carcinogenicity and chronic toxicity of para-chloronitrobenzene in rats and mice by two-year feeding. *J. Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006; 25:571-84.
2. Gaylor DW, Gold LS. Quick estimate of the regulatory virtually safe dose based on the maximum tolerated dose for rodent bioassays. *Regul Toxicol Pharmacol.* 1995; 22:57-63
3. Sawyer C, Peto R, Bernstein L, Pike MC. Calculation of carcinogenic potency from long- term animal carcinogenesis experiments. *Biometrics* 1984; 40: 27-40.

Nota 2

O TD₅₀ calculado para a hidrazina é ilustrado abaixo, uma vez que não estava listado no CPDB. Os cálculos de hidrazina foram baseados no tipo de tumor mais sensível: ratos fêmeas, adenoma e/ ou carcinoma hepatocelular (Ref. 1). As doses e incidências estão listadas abaixo

ppm	Dose (mg/kg/dia)	Número de Animais Positivos	Número total de animais
0	0	1	50
20	1,28	0	50
40	2,50	3	50
80	5,35	6	50

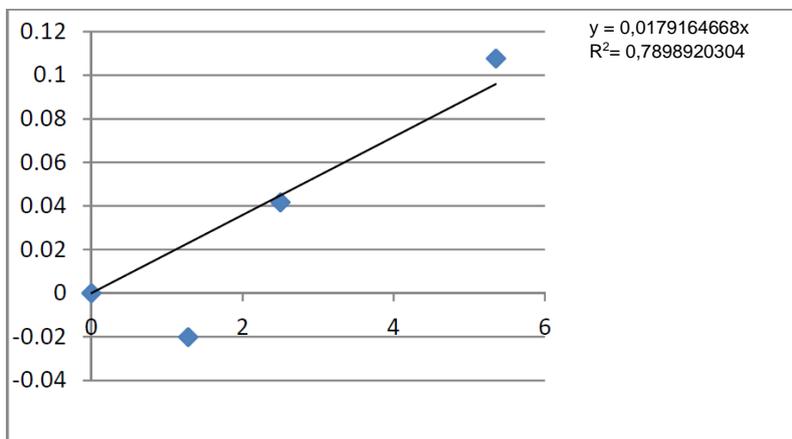
O TD₅₀ é calculado a partir de dados resumidos brutos da incidência de tumores em relação ao histórico, com a seguinte equação (Ref. 2, 3):

$$\frac{P - P_0}{1 - P_0} = 1 - \exp(-\beta \cdot D)$$

Onde P é a proporção de animais com o tipo de tumor especificado observado em uma determinada dose (D na equação) e P₀ é a proporção de animais com o tipo de tumor especificado para o controle. A conversão de β e D em uma equação linear simples resulta no seguinte:

$$\ln\left(-\left[\frac{P - P_0}{1 - P_0} - 1\right]\right) = \beta \cdot D$$

Traçando os resultados e usando a inclinação para representar os resultados de β no gráfico a seguir para a resposta à dose e β = 0,0179164668.



O TD₅₀ pode então ser calculado da seguinte forma.

$$0,5 = 1 - \exp(-\beta \cdot TD_{50})$$

A resolução do TD₅₀ resulta na seguinte equação.

$$TD_{50} = \frac{0.693}{\beta}$$

Portanto, o TD₅₀ = 0,693/0,0179164668 ou 38,7 mg/kg/dia.

Referências

1. Matsumoto M, Kano H, Suzuki M, Katagiri T, Umeda Y, Fukushima S. Carcinogenicity and chronic toxicity of hydrazine monohydrate in rats and mice by two-year água potável treatment. Regul Toxicol Pharmacol 2016;76:63-73.
2. Gaylor DW, Gold LS. Quick estimate of the regulatory virtually safe dose based on the maximum tolerated dose for rodent bioassays. Regul Toxicol Pharmacol.1995; 22:57-63.
3. Sawyer C, Peto R, Bernstein L, Pike MC. Calculation of carcinogenic potency from long- term animal carcinogenesis experiments. Biometrics 1984; 40: 27-40.

Nota 3

O TD₅₀ calculado para o cloreto de metila é ilustrado abaixo, uma vez que não estava listado no CPDB. Como o estudo do cloreto de metila (Ref. 1, 2) é baseado na inalação, as concentrações de ppm inaladas precisam ser convertidas em dose.

ppm	Dose (mg/kg/dia) ¹	Número de Animais Positivos	Número total de animais
0	0	0	67
50	28	0	61
225	127	2	57
1000	566	22	86

1. conversão de ppm para mg/kg/dia - X ppm x 50,5 g/mol (peso mol)/24,45 x 0,043 (volume respiratório) x 6/24 horas x 5/7 dias/0,028 kg (peso do camundongo) = dose mg/kg/dia

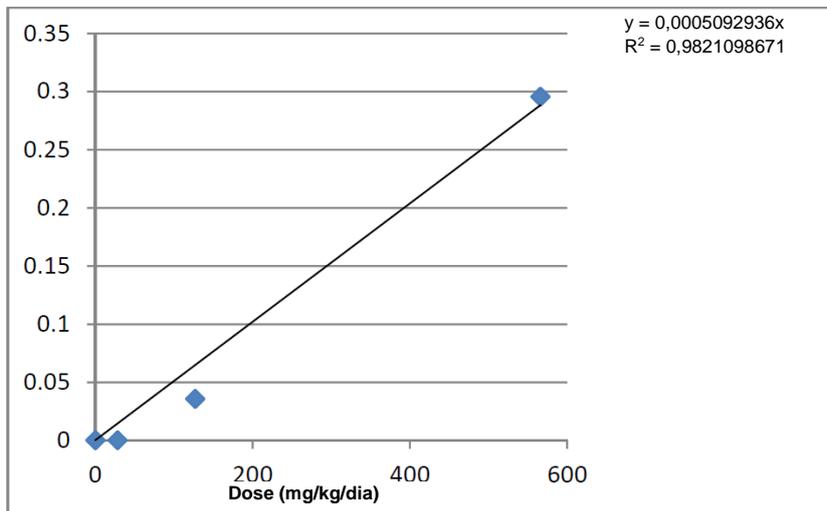
O TD₅₀ é calculado a partir de dados brutos de resumo da incidência de tumores em relação ao histórico, com a seguinte equação (Ref. 3, 4):

$$\frac{P - P_0}{1 - P_0} = 1 - \exp(-\beta \cdot D)$$

Onde P é a proporção de animais com o tipo de tumor especificado observado em uma determinada dose (D na equação) e P₀ é a proporção de animais com o tipo de tumor especificado para o controle. A conversão de β e D em uma equação linear simples resulta no seguinte:

$$\ln\left(-\left[\frac{P - P_0}{1 - P_0} - 1\right]\right) = \beta \cdot D$$

Traçando os resultados e usando a inclinação para representar os resultados de β no gráfico a seguir para a resposta à dose e β = 0,0005092936.



O TD₅₀ pode então ser calculado da seguinte forma.

$$0,5 = 1 - \exp(-\beta \text{TD}_{50})$$

A resolução do TD₅₀ resulta na seguinte equação.

$$\text{TD}_{50} = \frac{0.693}{\beta}$$

Portanto, o TD₅₀ = 0,693/0,0005092936 ou 1360,7 mg/kg/dia.

Referências

1. CIIT. Final report on a chronic inhalation toxicology study in rats and mice exposed to methyl chloride. Report prepared by Battelle Columbus Laboratories for the CIIT. 1981 EPA/OTS Doc #878212061, NTIS/OTS0205952.
2. US EPA. Toxicological review of methyl chloride. (CAS No. 74-87-3). In Support of Summary Information on the IRIS. EPA/635/R01/003. 2001.
3. Gaylor DW, Gold LS. Quick estimate of the regulatory virtually safe dose based on the maximum tolerated dose for rodent bioassays. Regul Toxicol Pharmacol.1995; 22:57-63.
4. Sawyer C, Peto R, Bernstein L, Pike MC. Calculation of carcinogenic potency from long- term animal carcinogenesis experiments. Biometrics 1984; 40: 27-40.