

Toxicologia *in silico*: contexto de aplicação e o modelo de custo-efetividade nos testes alternativos

Carlos Eduardo Matos dos Santos

Farmacêutico e Toxicólogo. Analista de gerenciamento de risco toxicológico da Intertox. Experiência em Toxicologia Computacional & *In Silico*, Toxicologia Ambiental, e assuntos regulatórios. E-mail: carlos@intertox.com.br

Aretha Sessa Rodrigues

Farmacêutica especializada em Toxicologia Analítica pela UNICAMP. Analista de risco toxicológico da Intertox. Farmacêutica especializada em Toxicologia Analítica pela Universidade Estadual de Campinas - Unicamp. Experiência em laboratório de análises físico-químicas, ecotoxicologia e controle de qualidade. Participação ativa em projetos de pesquisa na área toxicológica. Analista de risco toxicológico da Intertox. Instrutora de cursos na área de Segurança Química pela Intertox. E-mail: a.sessa@intertox.com.br

Resumo

O desenvolvimento de métodos alternativos para avaliação da toxicidade é um novo foco das organizações internacionais, com o objetivo de poupar animais em testes e de tornar acessível e custo-efetiva a avaliação da toxicidade de substâncias químicas. A modelagem *in silico* é uma das abordagens alternativas à utilização animal, e já vem sendo considerada por organizações internacionais em programas de pesquisa e desenvolvimento, ações regulatórias, programas de avaliação de risco, entre outros. Os modelos *in silico* são baseados em diferentes abordagens, tais quais (Q)SAR – (*Quantitative*) *Structure-Activity Relationships*, formação de categoria, análise de tendência, métodos de extrapolação etc. Para dar suporte à aceitação regulatória de modelos Q(SAR), a OECD publicou um guia de validação de modelos (Q)SAR, que definem princípios a serem

considerados na aplicação em predições de toxicidade. Neste trabalho faz-se uma revisão de relatórios técnicos, guias, abordagens estratégicas, ações regulatórias de agências internacionais, que dispõem sobre a modelagem *in silico* e seu contexto diverso de aplicação, bem como a discussão das perspectivas de utilização no Brasil.

Palavras-chave: Métodos Alternativos. Toxicologia *in silico*. Modelos *in silico*. Filosofia 3R.

Abstract

The development of alternative methods for assessment of toxicity is a new focus of international organizations, in order to save animals in testing and to make accessible and cost-effective evaluation of the toxicity of chemicals. The *in silico* modeling is one of the alternative approaches to animal use, and is already being considered by international organizations in research and development programs, regulatory actions, programs, risk assessment, among others. The *in silico* models are based on different approaches, such that (Q)SAR–(Quantitative) *Structure-Activity Relationships*, category formation, trend analysis, extrapolation methods etc. To support the regulatory acceptance of models Q (SAR), the OECD published guide validation of (Q)SAR that define principles in the application to be considered in predictions of toxicity. In this paper we provide a review of technical reports, guides, strategic approaches, regulatory actions of international agencies, which provide for the *in silico* modeling and its different context of application as well as discussion of prospects in Brazil.

Keywords: Alternative Methods. *In silico* Toxicology. *In silico* models. Philosophy 3R.

INTRODUÇÃO

Grande ênfase vem sendo dada ao desenvolvimento de métodos alternativos para a avaliação da toxicidade. Visando poupar animais em testes, agências reguladoras integram o desenvolvimento de tecnologias, métodos alternativos, e abordagens estratégicas para a priorização de testes com animais nos programas de avaliação de substâncias.

Os testes alternativos fazem parte da filosofia conhecida como “*3R philosophy*” ou seja *Replacement, Refinement and Reduction* (Substituição, Refinamento e Redução) em relação aos testes com animais, e que é citada no primeiro capítulo do documento “*Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals*”, publicado pelo *National Research Council* em 2009 (NRC, 2009).

Nos Estados Unidos, a *USEPA (United States Environmental Protection Agency)*, em seus programas de pesquisa e segurança toxicológica *ExpoCast, ToxCast e Tox21*, tem integrado abordagens inovadoras, como testes *in vivo* com tecnologia HTS (*High-Throughput Screening*) e modelagem computacional, para a avaliação da segurança das substâncias (USEPA, 2011a).

Outros países desenvolvidos têm se preocupado com a utilização excessiva de animais, incentivando o desenvolvimento de abordagens alternativas à utilização animal, em alguns casos inserindo até mesmo medidas para o controle de testes em animais, como no caso da regulação de cosméticos na Europa, que proíbe a realização de testes com animais, considerando a existência de métodos alternativos, por meio das emendas da *Diretiva de Cosméticos - Council Directive 76/768/EEC* (EUROPEAN COMMISSION, 1976).

No Brasil, a *Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)*, num primeiro passo, assinou acordo de cooperação com a *FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz)* para a validação de métodos alternativos, com o objetivo de reduzir a experimentação animal em testes de segurança ou pré-clínicos (ANVISA, 2011; INCQS, 2011).

A modelagem *in silico* é uma das alternativas aos testes de toxicidade, do âmbito da Toxicologia Computacional, ciência na qual se aplicam modelos computacionais e matemáticos para a predição de efeitos adversos, e para o melhor entendimento do(s) mecanismo(s) através do(s) qual(is) uma determinada substância provoca o dano, o que, na definição mais abrangente de outros autores, inclui os modelos de predição de exposição interna e externa, organização de dados toxicológicos e atribuição de peso às evidências de toxicidade (IUPAC *apud* SANTOS, 2011; CRONIM, 2010).

A modelagem *in silico* pode ser baseada em diferentes princípios metodológicos ou da combinação destes, tais quais (Q)SAR – (*Quantitative*) *Structure-Activity Relationships*, formação de categoria, análise de tendência, métodos de extrapolação etc., e que são aplicados em softwares de agências como a USEPA, OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) e Comissão Européia.

O presente trabalho tem como objetivo apresentar revisão das mais recentes abordagens estratégicas e guias de orientação de organizações internacionais, que incluem modelos *in silico* como métodos alternativos para a predição da toxicidade de substâncias, considerando os diferentes escopos (pesquisa e desenvolvimento, identificação e classificação de perigo, avaliação de risco, ações regulatórias, entre outros), bem como as perspectivas da Toxicologia *in silico* no Brasil para o setor produtivo e regulador.

Validação de modelos (Q)SAR e aceitação regulatória

Em 2004, foi feita discussão quanto à aceitação de modelos (Q)SAR por parte de agências regulatórias. A OECD, considerando o esforço internacional para nortear a tecnologia (Q)SAR com princípios e aplicações definidas, elaborou em 2006 um relatório contendo estudos de casos com exemplos de aplicações de modelos (Q)SAR para fins regulatórios em agências de diferentes países, bem como as perspectivas de tais aplicações.

Em 2007, considerando os esforços internacionais para aceitação regulatória de modelos (Q)SAR, a OECD publicou o documento “*Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationships [(Q)SAR] Models*”, com o propósito de orientar a validação metodológica na aplicação dos modelos, como também, auxiliar as agências regulatórias a definir seus próprios critérios de validação e aceitação (OECD, 2007).

No documento foram definidos cinco princípios da OECD para validação de modelos QSAR: (i) o modelo QSAR deve ter um “*endpoint* definido”; (ii) o modelo QSAR deve ser expresso sob a forma de “um algoritmo inequívoco”; (iii) o modelo QSAR devem ser associados a “um domínio de aplicabilidade definido; (iv) o modelo QSAR deve ser associado com “medidas apropriadas de desempenho (ex. performance interna, robustez e previsibilidade)”; e (v) o modelo QSAR deve ter uma interpretação mecanística. Tais princípios também conhecidos como “*princípios de Setubal*”, foram propostos em um workshop sobre aceitação regulatória de modelos QSARs, organizado pelo ICCA (*International Council of Chemical Associations*) e European Chemical Industry Council (*CEFIC*), realizado em 2002, em Portugal, na cidade de Setubal (ECHA, 2009; OECD, 2007).

ISO 10993-10:2010 – avaliação de dispositivos médicos

A ISO (*International Organization for Standardization*) publicou guia de padronização dos procedimentos para a avaliação de dispositivos médicos que inclui métodos *in vitro* e *in silico* como pré-testes. A descrição é feita na parte 10 da ISO 10993:2010, sobre testes de irritação e sensibilização dérmica (ISO, 2010).

In Silico em Pesquisa e Desenvolvimento – P&D

Além da questão do atendimento a regulamentações, muitos líderes empresariais têm reconhecido a necessidade de se fazer predições de toxicidade,

devido às vantagens competitivas que podem ser obtidas com a possibilidade de identificar antecipadamente a toxicidade de novas moléculas (CRONIM, 2010). Sob nosso ponto de vista, uma vantagem competitiva, que também é de rápida execução e de baixo custo, e ainda, que racionaliza a utilização animal, pode tornar mais competitivo o setor de P&D.

Ultimamente, tem surgido uma nova pressão - contra a utilização animal irracional e excessiva, o que implica na busca de testes alternativos no processo de desenvolvimento de novas substâncias e produtos (CRONIM, 2010).

Como exemplo, tendo um grupo de 100 moléculas a avaliar, é possível (e sensato) reduzir a quantidade de testes com animais, pela priorização feita com base nos resultados da avaliação *in silico*. Além disso, é possível a eliminação dos agentes potencialmente mais tóxicos, antes mesmo do processo síntese.

In Silico e GHS (Globally Harmonized System)

O GHS (*Globally Harmonized System of classification and labeling of chemicals*) faz parte do esforço da ONU (Organização das Nações Unidas) para aplicação de um sistema unificado de classificação e rotulagem de produtos químicos. A primeira edição do livro oficial conhecido como livro Púrpura (*Purple Book*) foi lançada em 2003 e traz como objetivos da aplicação do sistema: aumentar a proteção da saúde humana e meio ambiente, fornecendo um sistema internacionalmente compreensível para comunicação de riscos, como também facilitar o comércio internacional de produtos químicos cujos riscos foram apropriadamente avaliados e identificados em uma base de dados internacional (ABNT, 2009).

O Sistema apresenta ainda diferentes possibilidades para a redução do uso de animais em ensaios de perigos à saúde humana e meio ambiente, permitindo a utilização de dados de produtos (matéria-prima e misturas) testados anteriormente ou já classificados em outros sistemas de classificação, como é o caso dos produtos classificados pela IARC (*International Agency for Research on*

Cancer – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer), como também a aceitação de métodos alternativos como métodos *in vitro* e o uso de QSAR.

Algumas vezes o uso de QSAR pode ser limitado quando não há dados ou modelos confiáveis. Nesse contexto, a aplicação adequada da metodologia QSAR é citada no decorrer do Anexo IX – “Guia de perigos para o ambiente aquático”, o qual apresenta um tópico (A 9.6) exclusivo sobre o assunto.

De acordo com o *Livro Púrpura*, dados derivados de testes experimentais são preferencialmente aceitos, no entanto, quando estes não estiverem disponíveis a metodologia validada do QSAR pode ser aplicada sem prejuízo à classificação, considerando agentes químicos cuja aplicabilidade seja bem estabelecida. A modelagem QSAR pode ser feita para predição de: (i) toxicidade aquática para peixes, microcrustáceos e algas; (ii) Log k_{ow} em substâncias não-eletrólitos, não-eletrofílicas e não reativas; e (iii) (bio)degradabilidade, respeitando-se critérios específicos (UNITED NATIONS, 2011).

No contexto de predições para toxicidade aquática, destaca-se que para algumas substâncias o uso de QSAR é limitado, como no caso de organofosforados, que agem através de mecanismos específicos de interação com receptores biológicos. Por outro lado, têm sido derivados modelos QSAR confiáveis para agentes químicos que agem através do mecanismo narcótico, tais quais hidrocarbonetos, alcoóis, cetonas, e certos hidrocarbonetos alifáticos clorados, cujos efeitos são produzidos em função de seu coeficiente de partição (UNITED NATIONS, 2011).

Quando não há log K_{ow} experimentais confiáveis disponíveis, pode ser feita a modelagem QSAR em vez de se fazer uma determinação analítica, especialmente para ácidos e bases fortes, substâncias que reagem com o eluente, ou substâncias superfície-ativas. No caso de substâncias muito solúveis em água, muito lipofílicas e os surfactantes, para as quais a determinação experimental do log K_{ow} nem sempre é possível, a modelagem QSAR também pode ser aplicada.

Diferentes métodos são recomendados para classificação no GHS, conforme quadro abaixo:

Quadro 1. Modelos QSAR recomendados para predição do K_{ow} (Adaptado de UNITED NATIONS, 2011).

Modelo	Faixa de Log K_{ow}	Substâncias utilizadas
CLOGP	$0 < \log K_{ow} < 9^a$	O programa calcula log K_{ow} para compostos orgânicos contendo C, H, N, O, Hal, P e ou S.
LOGKOW (KOWWIN)	$-4 < \log K_{ow} < 8^b$	O programa calcula log K_{ow} para compostos orgânicos contendo C, H, N, O, Hal, Si, P, Se, Li, Na, K ou Hg. E alguns surfactantes (como álcool etoxilado).
AUTOLOGP	$\log K_{ow} > 5$	O programa calcula log K_{ow} para alguns compostos orgânicos contendo C, H, N, O, Hal, P e S.
SPARC	Proporciona melhores resultados que KOWWIN e CLOGP para compostos com $\log K_{ow} > 5$	SPARC é um modelo mecanístico baseado em princípios de termodinâmica. Somente SPARC pode ser aplicado como modelo geral para inorgânicos e compostos organometálicos.

^a O programa demonstrou predições precisas para um grande número de produtos químicos orgânicos com log K_{ow} entre 0 e 9.

^b Comprovadamente válido para compostos com log K_{ow} dentro do intervalo -4 a 8.

Em relação à degradabilidade (abiótica), foram desenvolvidos alguns modelos QSAR para predição do valor aproximado da meia-vida por hidrólise, mas o uso de tais modelos é indicado apenas quando não há dados experimentais disponíveis. Para fins de classificação, o dado sobre meia-vida por hidrólise deve ser usado com cuidado, pois este não indica a degradabilidade final de uma substância. Em casos como este, torna-se indispensável a avaliação de especialistas.

Quanto à biodegradabilidade, não há ainda modelo quantitativo (QSAR) com acurácia suficiente para a predição da rápida biodegradabilidade, no entanto

os resultados obtidos por tais métodos podem ser aplicados para prever que uma substância não é rapidamente degradável.

Avaliação de metabólitos e produtos de degradação de agentes químicos em alimentos como suporte em decisões regulatórias

Sabe-se que em avaliação de agentes químicos em alimentos (intencionais – aditivos, flavorizantes, conservantes, ou suplementos; ou inadvertidamente presentes – poluentes ambientais, resíduos de praguicidas e agentes de uso veterinário, componentes de materiais em contato com o alimento, agentes formados durante o processo produtivo ou por contaminantes biológicos), é geralmente limitado o conhecimento sobre as propriedades toxicológicas de metabólitos e/ou produtos de degradação do toxicante avaliado. Assim, torna-se não praticável a utilização de modelos animais para avaliação de todos os potenciais produtos de metabolismo ou degradação, sendo necessário o suporte de testes alternativos, como no caso de modelos computacionais (WORTH, 2011).

Neste contexto, em um projeto intitulado PESTISAR, guiado pelo *Joint Research Centre (JRC)* da Comissão Europeia, avaliou-se a potencial aplicabilidade de modelos computacionais (QSAR, SAR e *expert systems*) em avaliação toxicológica de metabólitos e produtos de degradação de praguicidas em alimentos, para fins de avaliação de risco com fins regulatórios. Como resultado, um relatório final do projeto publicado este ano, apresenta considerações sobre quais modelos e sistemas atualmente disponíveis seriam aplicáveis em avaliação de risco (modelagem por *endpoint*) em segurança alimentar, após revisão de literatura e experiência de especialistas. Tal relatório de suporte científico foi uma colaboração do *JRC* com a agência reguladora do contexto de alimentos *European Food Safety Authority (EFSA)* (WORTH, 2011).

Em pesquisa feita pelo projeto PESTISAR em relação ao uso de modelos computacionais na indústria e organizações governamentais, obteve-se 38 respostas de diferentes setores e países, com descrição de como e quando são

utilizados modelos QSAR, REA e outros. Verificou-se que em 37% dos casos as organizações faziam o uso de modelos computacionais em diferentes aplicações (ver alguns exemplos na Tabela 1), e, que em 60% não o faziam e desconsideravam o uso principalmente por falta de expertise no assunto.

Tabela 1. Alguns exemplos de desenvolvimento e usos de modelos (Q)SAR por organizações governamentais e pela indústria.

Organizações	Descrição	Referência
US Food and Drug Administration (FDA)	Existe um grupo de SAR que dá suporte a ações regulatórias sobre a segurança de aditivos alimentares no Office of Food Additive Safety	Yang et al.(2009)
Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt (Alemanha)	Avaliação de materiais de embalagem plástica em relação à carcinogenicidade, genotoxicidade, toxicidade para a tireóide, e outros <i>endpoints</i> para saúde humana	Rothenbacher et al. (2009)
Federal Agency for the Safety of the Food Chain (Bélgica)	Aplicação de metodologia SAR para comparar a toxicidade entre compostos químicos	AFSCA (2009)
Danish National Food Institute (Dinamarca)	Uso de (Q)SAR em classificação e rotulagem, e, identificação de agentes tóxicos para a reprodução	Jensen et al.(2008)
US Food and Drug Administration (FDA)	Uso de QSARs e expert system para predição da ocorrência e o modo de ação de carcinogênese em roedores (peso de evidência)	Matthews et al.(2008)
Nestlé Research Centre	Modelos computacionais são utilizados como suporte para a priorização em pesquisa, estabelecendo-se níveis de preocupação na ausência de dados toxicológicos experimentais	Tilaoui et al.(2007)
US Food and Drug Administration (FDA)	Uso de ferramentas SAR no programa de revisão substâncias em contatos com alimentos (<i>food contact substances – FCS</i>) em Avaliações de Risco.	Bailey et al.(2005)
US Food and Drug Administration (FDA)	Uso de métodos de toxicologia computacional para avaliação como suporte para ações regulatórias no contexto de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos	Kruhlik et al.(2007) Matthews & Contrera (1998)
US Environmental Protection Agency	Método de <i>scoring</i> de peso de evidência para a predição do potencial carcinogênico em roedores utilizando <i>expert systems</i> Priorização em pesquisa. Com base em análise relação estrutura-atividade fez-se o ranking segundo o potencial carcinogênico de subprodutos de desinfecção (<i>Disinfection by-products –DBP</i>)	Woo et al.(2002)

Adaptado de WORTH (2011)

Atual contexto dos métodos in silico na avaliação de nanomateriais e segurança de alimentos

Atualmente, tem sido amplamente discutida a questão da segurança na aplicação da nanotecnologia na indústria de alimentos. Sabe-se que entre as nanotecnologias do campo de alimentos, destacam-se as aplicações de nanopartículas em embalagens, com sistemas de ação antimicrobiana, proteção ultravioleta, resistência mecânica e barreira contra fluxo de gases e componentes voláteis, e a chegada das chamadas “embalagens inteligentes” que incorporam nanosensores que indicam o estado de conservação e a autenticidade dos alimentos; aditivos; e a aplicação em nutraceutica, com substâncias (vitaminas, antioxidantes e outros) encapsuladas em sistemas de nanoentrega (ou “nanodelivery systems”).

Existem estudos ainda inconclusivos quanto à biocinética de nanopartículas, sendo que as mesmas podem alcançar a circulação sistêmica permeando as barreiras epiteliais entre as células ou via endocitose. Sabe-se que a biotransformação de nanopartículas, dentre outras, depende da composição química da superfície da partícula (FAO/WHO, 2010).

O emprego de nanopartículas em alimentos foi objeto de discussão na *FAO/WHO (Food and Agriculture Organization and World Health Organization)* em 2010. No relatório sob o título “*Expert meeting on the application of nanotechnologies in the food and agriculture sectors: potential food safety implications*” são discutidas as fragilidades em relação à avaliação de risco dos nanomateriais em alimentos à saúde humana, ressaltando entre outras, a necessidade de desenvolvimento de métodos para se avaliar, entender e prever a toxicidade da nanomateriais, incluindo métodos *in vivo*, *in vivo*, e *in silico*, minimizando-se a utilização animal sempre que possível (FAO/WHO, 2010).

Burello e Worth (2011) apresentaram modelos QSAR recentes aplicados a nanomateriais, considerando a heterogeneidade na composição e no comportamento das nanopartículas. Os autores verificaram que a falta de conhecimento sobre o comportamento biológico das nanopartículas e de métodos para tal avaliação, dificulta a identificação das características estruturais responsáveis pela atividade biológica, que seriam a base para o desenvolvimento dos modelos.

In silico e GPS–Global Product Strategy

Recentemente, foi divulgada uma abordagem estratégica chamada *GPS (Global Product Strategy)*, proposta pelo *ICCA (International Council Chemical Associations)*, cujo objetivo é o de harmonizar de maneira global a avaliação de segurança de produtos da indústria, e de melhorar a transparência e a confiança do público em relação à mesma. Tais objetivos seriam os reflexos positivos do processo de Avaliação e Comunicação de Risco proposto no documento guia “*Global Product Strategy - ICCA Guidance on Chemical Risk Assessment*”.

Na ausência de dados de toxicidade, o documento guia do ICCA destaca que os testes com animais devem realizados sempre como últimos recursos, propondo a utilização de métodos alternativos, tais quais: (i) QSAR, (ii) abordagem *read-across*; (iii) métodos *in vitro*; entre outras abordagens. O guia faz referência a diferentes sistemas da metodologia *in silico* para a utilização em modelagem computacional, inclusive aqueles utilizados pela USEPA (ICCA, 2010).

Métodos in silico e abordagens alternativas no Japão

Em um documento sob o título “*R&D of In Vitro and In Silico Alternatives to Animal Testing under the Strategic R&D of Chemical Risk Analysis Technologies*”, são apresentados projetos no campo dos testes alternativos

(incluindo abordagens *in vitro* e *in silico*), guiados pela *NEDO* (*New Energy and Industrial Technology Development Organisation*), um órgão administrativo ligado ao Ministério da Economia, Comércio e Indústria (METI) do Japão (NEDO, 2009).

Regulação da avaliação de cosméticos pela Comissão Europeia e a importância do desenvolvimento de métodos alternativos

Desde 11 de setembro de 2004 vem sendo gradativamente aplicada a legislação europeia que proíbe a utilização de animais em testes com produtos cosméticos acabados ou com seus ingredientes individualmente (*proibição de testes*), com relação a *endpoints* específicos; e além da proibição de testes, é vetado o comércio na Comunidade Europeia de ingredientes e combinações destes que tenham sido testados com animais (*proibição do comércio*) em relação a *endpoints* definidos, desde 11 de março de 2011. As proibições são consideradas tendo-se alternativas aos modelos com animais, o que estimula o desenvolvimento e validação de métodos alternativos para cumprimento da regulação europeia (EUROPEAN COMMISSION, 1976; 2011).

Conforme as novas emendas na Diretiva de Cosméticos (*Council Directive 76/768/EEC*), a *proibição do comércio* de ingredientes testados poderá ser ampliada até 2013, abrangendo outros *endpoints* que estavam a atender este prazo, a saber: toxicidade para a reprodução, toxicidade em doses repetidas, e toxicocinética.

Em 2008 foi publicado um relatório sob o título “*Report on the Development, Validation and Legal Acceptance of Alternative Methods to Animal Tests in the Field of Cosmetics*”, que enfatizava a necessidade da validação de métodos alternativos em consideração às novas emendas da diretiva de cosméticos da Comissão Europeia.

Na 7ª revisão do documento “*The SCCS's notes of guidance for the testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation*”, publicado pelo Comitê Científico sobre Segurança do Consumidor (SCCS – *Scientific Committee on Consumer Safety*) da Comissão Europeia, são descritos procedimentos para avaliação da segurança de ingredientes de cosméticos, considerando métodos alternativos, como testes *in vitro* e modelos *in silico* (QSAR, read-across etc.), para a tomada de decisão no processo de avaliação de risco (EC, 2011).

Avaliação de impurezas e produtos de degradação em medicamentos

Quanto à avaliação de impurezas e produtos de degradação de novas drogas, a FDA (*Food and Drug Administration*) publicou o guia sob o título “*Guidance for Industry – Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products: Recommended Approaches*”, com recomendações para caracterizar e reduzir os riscos de câncer pela exposição a impurezas com propriedades carcinogênicas ou genotóxicas, durante os estudos clínicos ou após a aprovação da droga, com medidas específicas no caso de impurezas com suspeita de potencial genotóxico ou carcinogênico.

Segundo o projeto de guia FDA, caso seja encontrada impureza com níveis abaixo dos limites de qualificação ICH (*International Conference on Harmonization*): a impureza deve ser avaliada quanto à carcinogenicidade e genotoxicidade com base em *Avaliação da Relação Estrutura Atividade – REA (Structure Activity Relationship Assessment)*, com a identificação de alertas estruturais, que pode ser feita através de Toxicologia Computacional e revisão da literatura disponível. No caso de identificação de alertas estruturais, um ensaio de mutagenicidade *in vitro* de poderia ser aceitável como triagem inicial. Em caso de resultados negativos na triagem inicial, a impureza poderia ser considerada qualificada em relação à genotoxicidade, sem necessidade de testes posteriores (FDA, 2008).

Tal guia, ainda não compulsório, foi publicado para consulta pública e teve uso recomendado como complemento a outros três guias do ICH: o *Q3A(R2) Impurities in New Drug Substances*; o *Q3B(R2) Impurities in New Drug Products*; e o *Q3C(R3) Impurities: Residual Solvents*.

In silico e REACH

O REACH é o regulamento europeu para o Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos, cujas regras vêm sendo gradativamente implementadas, segundo critérios específicos, desde 2007, e que dependendo da tonelagem e das propriedades produto, exige o registro dentro de um cronograma específico. As substâncias devem ser avaliadas quanto à toxicidade e risco, e as informações são submetidas para fins de registro por meio de dossiê.

O anexo XI do regulamento do REACH, faz considerações sobre critérios e aplicações dos resultados obtidos de análise QSAR que podem ser utilizados em lugar de ensaios toxicológicos tradicionais, visando poupar animais em testes (EUROPEAN COMMISSION, 2006).

A ECHA (*European Chemicals Agency*) publicou guias de utilização de modelos *in silico*, dando ênfase à minimização de testes com animais. Sabe-se que sem testes custo-efetivos, o número de animais sacrificados e os custos para as empresas seriam altíssimos.

Programas de avaliação de segurança da USEPA

Os programas de avaliação de substâncias da USEPA integram de maneira inteligente os dados obtidos com testes *in vitro* [principalmente *HTS (High-Throughput Screening)*] com a modelagem computacional, visando identificar agentes químicos com potencial de interferir em vias celulares, considerando-se os níveis mais relevantes de exposição humana (USEPA, 2011a).

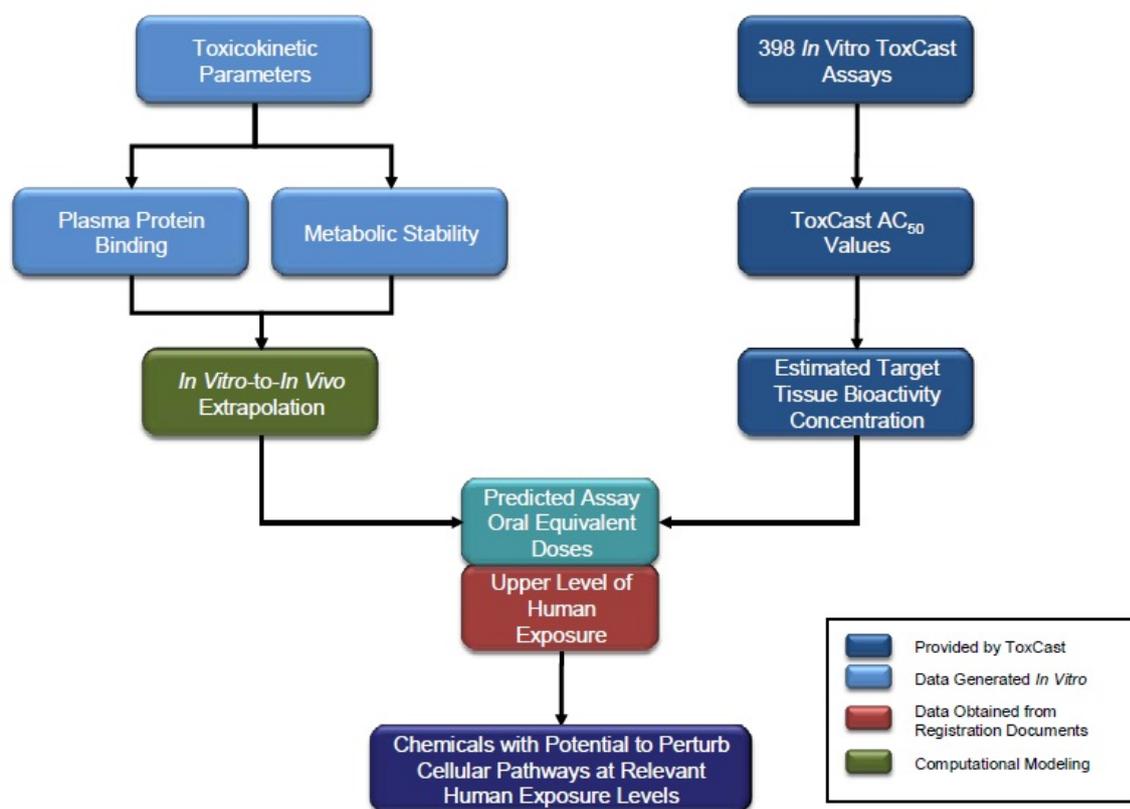


Figura 1. Integração de resultados de toxicidade e modelagem computacional para identificação de vias de toxicidade, considerando-se níveis de exposição relevantes para humanos (USEPA, 2011a)

O desenvolvimento de ferramentas computacionais nos programas da USEPA é de notável avanço. Uma das mais recentes cria um “*ToxScore*” pelo *ToxPi (Toxicological Priority Index)*, sendo possível estabelecer prioridades para a

avaliação de substâncias (*índice de prioridade*), com fundamento nas informações armazenadas nas bases dados (USEPA, 2011b).

$$\text{ToxPi} = f(\text{Chemical properties} + \text{In vitro assays} + \text{Pathways} + \text{Dosimetry})$$

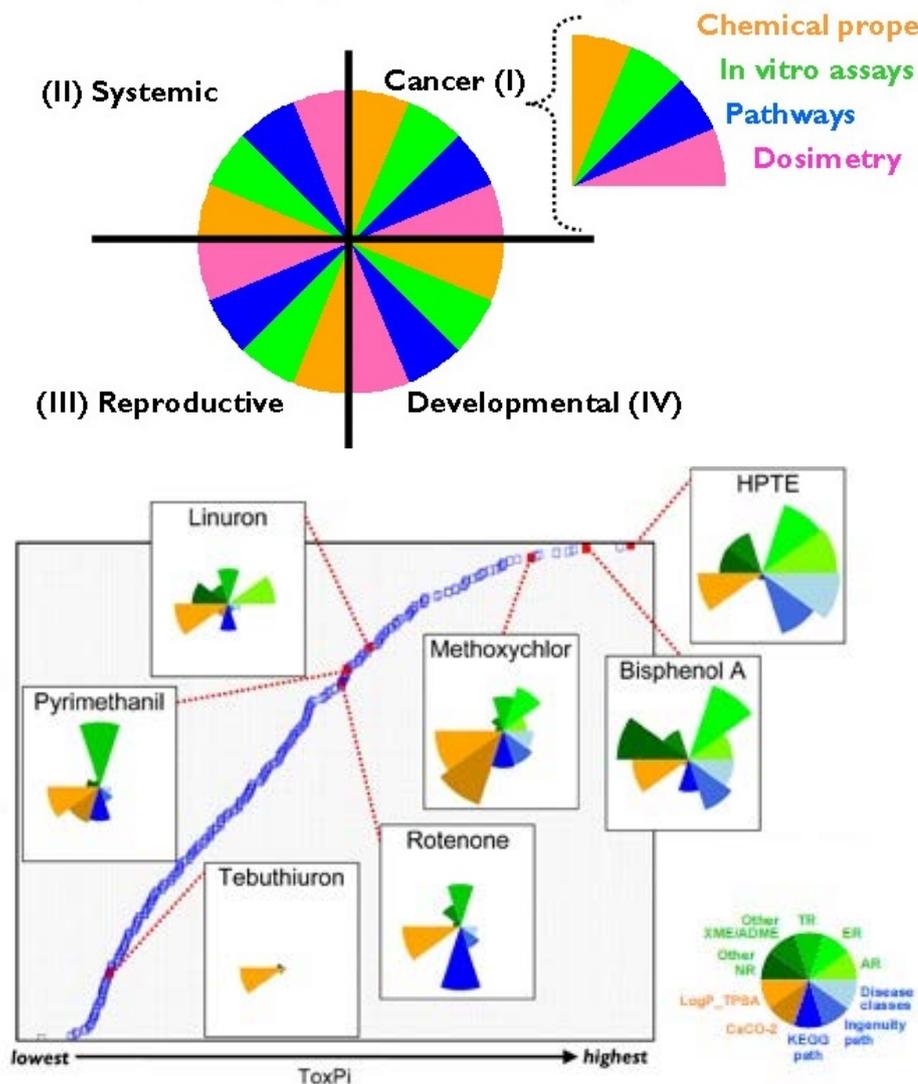


Figura 2. Estabelecimento de índice de prioridade para avaliação de substâncias (USEPA, 2011b)

Discussão

As perspectivas de aplicação dos modelos *in silico* e de outros métodos alternativos no Brasil são evidentes. Nessa nova etapa, o setor produtivo e o setor

SANTOS, Carlos Eduardo Matos dos; RODRIGUES, Aretha Sessa. Toxicologia *in silico*: contexto de aplicação e o modelo de custo-efetividade nos testes alternativos. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 4, n. 3, p. 92-113, out. 2011.

regulador poderão melhorar as políticas de segurança relacionadas aos produtos químicos com maior custo-efetividade e racionalização da utilização animal. O alinhamento dos modelos *in silico* com as políticas de agências reguladoras internacionais pode contribuir com o setor industrial no enfrentamento e adequação às regulações de outros países sobre produtos químicos.

O setor de Pesquisa e Desenvolvimento passa a ter maiores possibilidades e vantagens competitivas, já que a predição de toxicidade pode ajudar na priorização de testes com animais e contribuir para a seleção de moléculas com menor potencial de preocupação para a saúde humana e para o meio ambiente.

O setor regulador e de pesquisa pode passar a incorporar os métodos *in silico* nos casos que sempre foram um desafio devido aos custos e impraticabilidade da aplicação de métodos tradicionais, como no caso da avaliação de produtos de degradação e impurezas de substâncias em medicamentos e alimentos, como também a avaliação de substâncias para as quais há pouca informação sobre toxicidade disponível.

Se países desenvolvidos já consideram importante a chegada de métodos alternativos e custo-efetivos em suas políticas de segurança, para aqueles países em desenvolvimento, que já demandam de políticas de segurança e têm menos recursos para a realização de testes, certamente é maior a necessidade e muito proveitosos serão os benefícios do planejamento de uma abordagem integrada de testes alternativos com priorização e racionalização de testes com animais.

Considerações finais

Os avanços da Toxicologia e dos modelos *in silico* estão tornando mais praticável e custo-efetivo o processo de avaliação da toxicidade, considerando a extensa quantidade de substâncias químicas produzidas, que pelos métodos clássicos representariam um custo elevadíssimo e modelo de sacrifício de animais impraticável. Cabe que cada país se atualize quanto aos avanços tecnológicos e científicos, já que este verdadeiro novo paradigma proposto pode trazer melhorias

nas políticas de segurança para a saúde humana e para o meio ambiente, além de trazer maior êxito para o setor produtivo no desenvolvimento de substâncias e no comércio internacional, considerando-se suas novas tendências.

REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14725**: Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ). Rio de Janeiro, 2009.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **ANVISA realiza reunião no Rio de Janeiro em homenagem ao INCQS**. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/assunto+de+interesse/noticias/anvisa+realiza+reuniao+no+rio+de+janeiro+em+homenagem+ao+incq>> Acesso em: 15 set. 2011.

BURELLO, E.; WORTH, A.P. QSAR modeling of nanomaterials. John Wiley & Sons: Inc. Wiley Interdisciplinary Reviews: **Nanomedicine Nanobiotechnology**, Ispra, v. 3, n. 3, p. 298-306, 2011.

CRONIN, M. T. D.; MADDEN, J. C. **In Silico Toxicology**: Principles and Applications. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2010.

ECHA - EUROPEAN CHEMICALS AGENCY. **Guia prático 5**: como comunicar (Q)SAR. Helsínquia: ECHA, 2009.

EUROPEAN COMMISSION. **COUNCIL DIRECTIVE 76/768/EEC of 27 July 1976 on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products**. Disponível em:<<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1976L0768:20100301:en:PDF>>. Acesso em: 11 out. 2011.

EUROPEAN COMMISSION. **REGULAMENTO DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO N. 1907/2006, DE 18 DE DEZEMBRO DE 2006**. Dispõe

sobre registro, avaliação, autorização e restrição de substâncias químicas (REACH). Anexo XI, p. 120, 2006. Disponível em: <<http://eurex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:136:0003:0280:pt:PDF>>. Acesso em: acesso em 11 de out. 2011.

EUROPEAN COMMISSION. Scientific Committee on Consumer Safety. **Notes of Guidance for Testing of Cosmetic Ingredients and Their Safety Evaluation by the SCCS**. Brussels: SCCS, 2011. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/consumer_safety/docs/sccs_s_004.pdf> acesso em 18 de set. de 2011

FAO/WHO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WORLD HEALTH ORGANIZATION. **FAO/WHO Expert meeting on the application of nanotechnologies in the food and agriculture sectors: potential food safety implications**. Italy: FAO and WHO, 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/i1434e/i1434e00.pdf>> acesso em 01 de out. de 2011

FDA- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry Genotoxic and Carcinogenic Impurities in Drug Substances and Products: Recommended Approaches**. Rockville: Center for Drug Evaluation and Research, 2008. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm079235.pdf>> acesso em 03 de set. de 2011.

ICCA - INTERNATIONAL COUNCIL CHEMICAL ASSOCIATIONS. **Global Product Strategy: ICCA Guidance on Chemical Risk Assessment**. Brussels: ICCA, 2010.

INCQS – INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE. **ANVISA e INCQS: parceira contra o uso de animais**. Disponível em: <http://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=article&id=815:anvisa-aprova-parceria-com-incqs-para-excluir-animais-de-pesquisas&catid=42:noticias-do-site&Itemid=132> Acesso em: 15 set. 2011.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-10:2010: Biological evaluation of medical devices -- Part 10: Tests for irritation and skin sensitization**. Disponível em:

<http://www.iso.org/iso/catalogue_detail?csnumber=40884>. Acesso em: 2 out. 2011.

NEDO - NEW ENERGY AND INDUSTRIAL TECHNOLOGY DEVELOPMENT ORGANISATION. **R&D of In Vitro and In Silico Alternatives to Animal Testing under the Strategic R&D of Chemical Risk Analysis Technologies by NEDO**. Japan: NEDO, 2009.

NCR - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory**. Washington: Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory, 2009.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance Document on the Validation of (Quantitative)Structure-Activity Relationships [(Q)SAR] Models**. Paris: Inter-Organisation Programme for the Sound Management of Chemicals (IOMC), 2007. 154 p.

SANTOS, C. E. M. Toxicologia in silico: uma nova abordagem para análise do risco químico. **RevInter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 4, n.1, p. 47-63, fev. 2011.

UNITED NATIONS. **Globally Harmonized System of Classification And Labelling Of Chemicals (GHS)**. 4. ed. New York And Geneva: UNECE, 2011.

USEPA - U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Using ToxCast™ In Vitro Screening Data for Chemical Prioritization Incorporating Human Exposure and Dosimetry**. Disponível em: <http://epa.gov/ncct/download_files/factsheets/RTK_FactSheet09-22-2010.pdf>. Acesso em: 10 out. 2011a.

USEPA - U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **ToxPi**. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ncct/ToxPi/>>. Acesso em: 10 out. 2011b.

WORTH, A. et al. **The Use of Computational Methods in the Toxicological Assessment of Chemicals in Food: Current Status and Future Prospects.** Luxembourg: Joint Research Centre - European Union, 2011. 143 p.