



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JEANE-JAQUELINE-FRANÇOISE DE ALMEIDA FONSECA

**PERSPECTIVAS E USOS DE (Q)SAR E DE OUTROS
MÉTODOS COMPUTACIONAIS NA AVALIAÇÃO DE
PERIGO DE AGROTÓXICOS**

Brasília
2013

JEANE-JAQUELINE-FRANÇOISE DE ALMEIDA FONSECA

**PERSPECTIVAS E USOS DE (Q)SAR E DE OUTROS
MÉTODOS COMPUTACIONAIS NA AVALIAÇÃO DE
PERIGO DE AGROTÓXICOS**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Profissional em Toxicologia Aplicado à Vigilância Sanitária da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Antonia Tavares do Amaral

Brasília
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F676p Fonseca, Jeane-Jaqueline-Françoise de Almeida.
Perspectivas e usos de (Q)SAR e de outros métodos computacionais na avaliação de perigo de agrotóxicos / Jeane-Jaqueline-Françoise de Almeida Fonseca. – Londrina, 2013.
128 f. : il. + apêndices e anexos no final da obra.

Orientador: Antonia Tavares do Amaral.
Dissertação (Mestrado Profissional em Toxicologia Aplicada à Vigilância Sanitária) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Toxicologia Aplicada à Vigilância Sanitária, 2013.
Inclui bibliografia.

1. Produtos químicos agrícolas – Teses. 2. Toxicologia – Teses. 3. QSAR (Bioquímica) – Teses. 4. Modelos matemáticos – Validação – Teses. I. Amaral, Antonia Tavares do. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Toxicologia Aplicada à Vigilância Sanitária. III. Título.

CDU 615.9:632.95

JEANE-JAQUELINE-FRANÇOISE DE ALMEIDA FONSECA

**PERSPECTIVAS E USOS DE (Q)SAR E DE OUTROS
MÉTODOS COMPUTACIONAIS NA AVALIAÇÃO DE
PERIGO DE AGROTÓXICOS**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Profissional em Toxicologia Aplicado à Vigilância Sanitária da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Toxicologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Antonia Tavares do Amaral
Universidade Estadual de São Paulo – USP

Profa. Dra. Monica Bastos Paoliello
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Lilian Rothschild
Universidade de São Paulo - USP

Brasília, 5 de Outubro de 2013.

FONSECA, Jeane-Jaqueline-Françoise de Almeida. **Perspectivas e usos de (Q)SAR e de outros métodos computacionais na avaliação de perigo de agrotóxicos.** 2013. 128f. Dissertação (Mestrado Profissional de Toxicologia Aplicada à Vigilância Sanitária) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Considerando a necessidade de avaliar a segurança do uso dos compostos químicos aos quais as populações estão expostas, a utilização de métodos alternativos, que não utilizam animais para experimentação, vem crescendo a cada dia. Entre esse métodos destaca-se as abordagens que empregam métodos computacionais para estabelecer e analisar a relação entre a estrutura química e a atividade biológica de determinado composto. No entanto, para que essa abordagem seja considerada válida e possa ser utilizada no ambiente regulatório alguns princípios para obtenção do modelo (Q)SAR foram definidos internacionalmente para facilitar sua aceitação pelos órgãos de governo e também para que os usuários tivessem definidos quais os passos a serem seguidos na construção de um modelo (Q)SAR. No Brasil, pouco dessa abordagem é, ainda, utilizada. Isso ocorre devido ou a ausência da necessidade regulatória, ou pela falta de conhecimento para aplicação dessa abordagem de forma que atenda à essas necessidades. Propõe-se, nesse trabalho, a utilização regulatória na avaliação toxicológica de agrotóxicos, mais especificamente, em produtos técnicos equivalentes. Para tanto, será realizada uma apresentação dos conceitos que essa abordagem envolve, juntamente com os critérios definidos internacionalmente para validação dos modelos (Q)SAR, assim como uma proposta para sua utilização na avaliação toxicológica de produtos técnicos equivalentes.

Palavras-chave: Agrotóxico. Equivalência. (Q)SAR. validação.

FONSECA, Jeane-Jaqueline-Françoise de Almeida - **Perspectives and Uses of (Q)SAR and others computational methods in the hazard evaluation of pesticides**. 2013. 128p. Dissertation (Professional Master of Applied Toxicology for Health Surveillance) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Considering the need to assess the safety of the use of chemicals to which people are exposed, the use of alternative methods that do not require animals for experimentation is growing every day. Among those methods stand out approaches that employ computational methods to establish and analyze the relationship between chemical structure and biological activity of a given compound. However, in order to apply these approaches for regulatory purposes, some principles have been defined internationally to generate valid (Q)SAR models in order to facilitate the acceptance of new methods by government agencies and also as a guide for users who have defined what steps should be followed in constructing a model (Q) SAR. In Brazil, only few of this approaches have been used, due to absence of regulatory requirements or lack of the knowledge for the application of this approach in the way that meets the requirements. The main goal of this work is to propose their use in regulatory toxicological evaluation of pesticides, specifically in equivalence of technical products. Therefore, this work contains a presentation of the concepts that these approaches involve, together with the internationally defined criteria for validation of (Q)SARs, as well as proposal for their use in toxicological assessment of equivalence of technical products.

Keywords: Pesticides. Equivalence. (Q)SAR and validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Exemplos de alguns descritores moleculares 1D, 2D e 3D que podem ser utilizados para representar o composto 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-1,4-benzodiazepin-2(2H)-ona (diazepam - CAS número 439-14-5)	20
Figura 2 -	Esquema do procedimento sugerido para divisão dos compostos em séries para a construção e para a validação de um modelo (Q)SAR e as respectivas porcentagens de compostos, geralmente, incluídos em cada série, de acordo com Tropsha (2010) e Martin et al. (2012).	31
Figura 3 -	Esquema ilustrativo dos aspectos do domínio de aplicabilidade (DA) de um modelo (Q)SAR	44
Figura 4 -	Esquema proposto para os procedimentos de validação interna e validação externa para obtenção de modelos QSAR preditivos, com a inclusão de outra validação externa e com compostos pertencentes ao domínio de aplicabilidade (DA) que não foram utilizados na validação inicial.....	48
Figura 5 -	Esquema representativo do processo de avaliação de produtos técnicos equivalentes, suas respectivas fases I, II e III, e critérios que conduzem à fase seguinte de avaliação ou à conclusão sobre a não equivalência	55
Figura 6 -	Esquema ilustrativo relativo ao processo de avaliação da equivalência com base nos estudos de (Q)SAR e toxicológicos da Fase II e os prováveis resultados da comparação entre as predições ou estudos que poderiam levar a tomada de decisão de continuidade de avaliação para a Fase III ou conclusão sobre a não equivalência	67

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Exemplo das notações <i>SMILES</i> para alguns agrotóxicos, respectivamente, Azaconazol, Bitertanol, Bromuconazol, Ciproconazol e Difenconazol obtidos por meio do desenho de sua estrutura química no <i>software ACD/ChemSketch Freeware v. 12</i> e na base de dados <i>PUBCHEM</i>	21
Quadro 2 -	Matriz de contigência (2x2) utilizada na avaliação de preditividade de modelos de classificação por meio da estatística de Cooper (Quadro 3) "a", "b", "c" e "d" são os números de compostos com classe observada (Ativo/Não ativo) que tiveram uma classe atribuída(Tóxico/Não Tóxico) e os seus totais	33
Quadro 3 -	Nome dos critérios estatísticos, equações para cálculo e definições utilizadas na estatística de Cooper calculada com a utilização de uma matriz de contingência (Quadro 2) para validação de modelos de classificação	33
Quadro 4 -	Lista dos <i>Endpoints</i> avaliados, métodos e ferramentas utilizadas por algumas agências reguladoras, com as respectivas referências	49
Quadro 5 –	Exemplo ilustrativo das comparações realizadas entre os limites declarados dos componentes dos produtos de referência e do candidato à equivalente. Resultado parcial da comparação considerando cada componente e resultado final considerando todos os componentes, a adequabilidade da declaração. Prováveis tomadas de decisão.....	61
Quadro 6 –	Algumas diferenças encontradas relacionadas às exigências de estudos nas fases, respectivamente, I, II e III de avaliação de um produto técnico equivalente no Brasil, na EC e na FAO, sendo Imp a impureza contida na amostra	65
Quadro 7 -	Exemplo das possíveis interpretações das predições de um <i>endpoint</i> feitas por alguns sistemas especialistas, <i>DEREK</i> , <i>CAESAR</i> , <i>TOPKAT</i> e <i>ToxBox</i> , respectivamente, com o objetivo de uniformizar as predições para possibilitar a avaliação em bateria de vários sistemas especialistas, com o intuito de aumentar a confiança da predição.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANN	Rede Artificial Neural
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	<i>Association of Analytical Communities</i>
APVMA	<i>Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authorities</i>
BPL	Boas Práticas Laboratoriais
CAESAR	<i>Computer Assisted Evaluation of Industrial Chemical Substances According to Regulations</i>
CAS	<i>Chemical Abstract System</i>
CIPAC	<i>Collaborative International Pesticides Analytical Council</i>
CL50	Concentração Letal mediana que afeta 50% de uma população teste
CM	<i>Classification Methods</i>
CoMFA	<i>Comparative molecular field analysis</i>
ComSIA	<i>Comparative molecular similarity indices analysis</i>
CTA	Comitê Técnico de Assessoramento em Agrotóxicos
DA	Domínio de aplicabilidade
DL50	Dose Letal mediana que afeta 50% de uma população teste
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EC	<i>European Community</i> ou Comunidade Européia
ECETOC	<i>European Center for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals</i>
ECHA	<i>European Chemical Agency</i>
ECVAM	<i>European Center for Validation of Alternative Methods</i>
EM	Espectroscopia de Massas
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GA	Algoritmo Genético
GHS	<i>Global Harmonisation System</i>
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis
ICH	<i>International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ITS	<i>Integrated Test Strategies</i>
IV	Infravermelho

<i>JRC</i>	<i>Joint Research Centre</i>
<i>K-NN</i>	Agrupamento pela Vizinhança Mais Próxima (<i>k-Nearest Neighbourhood</i>)
<i>LOAEL</i>	<i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>
<i>LOO</i>	<i>Leave- One-Out</i>
<i>LSO</i>	<i>Leave-Some-Out</i>
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
<i>MIF</i>	<i>Molecular Interaction Field</i>
<i>MLR</i>	Regressão Linear Múltipla
<i>OECD</i>	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
<i>OPS</i>	<i>Optimum Prediction Space</i>
<i>PBPK</i>	<i>Physiologically Based Pharmacokinetic</i>
<i>PCA</i>	Análise dos Componentes Principais
<i>PCR</i>	Regressão dos Componentes Principais
<i>PLS</i>	Mínimos Quadrados Parciais
<i>QMRF</i>	<i>QSAR Model Report Format</i>
<i>QPRF</i>	<i>QSAR Prediction Report Format</i>
<i>QSAR</i>	Relação Quantitativa de Estrutura Atividade
<i>QSPR</i>	<i>Quantitative Structure Property Relationship</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>ROC</i>	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
<i>SAR</i>	Relação Estrutura Atividade
<i>SMILES</i>	<i>Simplified Molecular Input Line Entry System</i>
<i>U.S. EPA</i>	<i>Environmental Protection Agency of USA</i>
<i>ULR</i>	Regressão Linear Univariada
UV-DAD	Ultravioleta com sistema de Arranjo de Diodos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	(Q)SAR E OUTROS SISTEMAS ESPECIALISTAS	18
2.1	<i>QSAR</i>	18
2.1.1	<i>Descritores moleculares</i>	19
2.1.2	<i>Parâmetro Biológico</i>	22
2.1.3	<i>Construção de um modelo de QSAR</i>	23
2.1.3.1	Preparação dos dados	25
2.1.3.2	Análise dos dados	26
2.1.3.3	Validação do modelo:	28
2.2	<i>SAR</i>	31
2.3	Sistemas Especialistas	34
3	USOS E PERSPECTIVAS DE USO DE (Q)SAR E DE OUTROS SISTEMAS ESPECIALISTAS NO AMBIENTE REGULATÓRIO	37
4	PONTOS CRÍTICOS NA AVALIAÇÃO DE AGROTÓXICOS POR EQUIVALÊNCIA E SUA INTERFACE COM (Q)SAR	54
4.1	Análise da Fase I	55
4.2	Análise da Fase II	62
4.3	Análise da Fase III	67
4.4	Considerações Gerais sobre o processo de avaliação de equivalência	68
5	PROPOSTA DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA EXIGÊNCIA E AVALIAÇÃO DE ANÁLISES DE (Q)SAR DIRECIONADAS PARA AVALIAÇÃO DE PERIGO DE PRODUTOS TÉCNICOS EQUIVALENTES.	70
6	TENTATIVAS DE CONSTRUÇÃO DE MODELOS (Q)SAR	79
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

APÊNDICES	93
<i>Apêndice A – Proposta de revisão do Procedimento Operacional para análise de produto técnico equivalente com ênfase na avaliação da Fase II e relacionada a utilização da abordagem (Q)SAR e de outros Sistemas Especialistas</i>	94
<i>Apêndice B – Exemplo Prático 1: Exemplo da aplicação do procedimento proposto. Utilização de abordagem (Q)SAR na avaliação de equivalência entre produtos técnicos</i>	95
<i>Apêndice C - Relatório de Predição CAESAR para a impureza</i>	96
<i>Apêndice D - Relatório de Predição CAESAR para o ingrediente ativo IMIDACLOPRIDO</i>	97
<i>Apêndice E - Relatório de Predição CAESAR para o composto análogo TIACLOPRIDO</i>	98
<i>Apêndice F - Relatório de Predição CAESAR para o TIAMETOXAM</i>	99
<i>Apêndice G - Relatório de Predição CAESAR para o ACETAMIPRIDO</i>	100
<i>Apêndice H - Relatório de Predição CAESAR para CLOTIANIDINA</i>	101
<i>Apêndice I - Relatórios de Predição sumarizados para a impureza e os compostos análogos escolhidos relativo às predições obtidas no sistema LAZAR</i>	102
<i>Apêndice J – Exemplo Prático 2: Tentativas de construção de modelos QSAR</i>	103
 ANEXOS	104
<i>Anexo I – Adaptação do formato de relatório proposto pela EC (QPRF – (Q)SAR Prediction Report Format) para apresentação de predições realizados por (Q)SAR ou outros sistemas especialistas para o propósito de avaliação de impurezas em produtos técnicos equivalentes</i>	105
<i>Anexo II – Relatório de validação (RV) de modelo (Q)SAR que deverá ser apresentado juntamente com RP</i>	106
<i>Anexo III – Cópia dos quadros gerados por Lazar Toxicity Predictions para predição de todos os endpoints disponíveis para predição no sistema LAZAR da impureza e dos compostos escolhidos como análogos</i>	107
<i>Anexo IV- Cópia do Procedimento de Avaliação de Processos de Registro de Produtos Técnicos por Equivalência</i>	108

1 INTRODUÇÃO

(Q)SAR, (*Quantitative*) *Structure Activity Relationships*, sigla em inglês para as relações quantitativas entre a estrutura química e atividade biológica, podem ser considerados como modelos matemáticos que permitem descrever as complexas interações que ocorrem entre um determinado composto químico e o sistema biológico (ECETOC, 2003). Essas relações se baseiam na premissa de que estruturas químicas similares apresentam comportamentos químicos similares (OECD, 2007), podendo conduzir a efeitos biológicos similares.

Dessa forma, torna-se fundamental considerar e descrever corretamente tanto a estrutura química como a resposta ou atividade biológica de determinado composto, definidos respectivamente a seguir.

A estrutura química de um composto pode ser descrita de várias formas. Desde a mais simples representação, como número de átomos, de ligações, ausência ou presença de fragmentos etc, até as mais complexas, que consideram as características termodinâmicas do composto (ROGNAN, 2007). Quando essa descrição é codificada em um número, ela é chamada de descritor molecular ou estrutural (TODESCHINI; CONSONI, 2000). Assim, este pode ser utilizado tanto para a construção de modelos de *QSAR* tanto para o estudo e determinação da similaridade entre os compostos (NIKOLOVA; JAWORSKA, 2003).

Quanto mais este descritor molecular for efetivamente representativo de determinada estrutura molecular, maior sua importância para os modelos de *QSAR* (TODESCHINI; CONSONI, 2000).

Em contrapartida, descritores moleculares que não representam corretamente determinada estrutura, podem fazer com que compostos estruturalmente diferentes sejam representados pelo mesmo valor descritor. Nestas condições, afirma-se que o descritor não está validado, por não descrever corretamente a estrutura de determinado composto. E, como consequência, substâncias muito diferentes podem ser consideradas erroneamente similares, permitindo, portanto, que reatividades similares sejam atribuídas a compostos não similares (NIKOLOVA; JAWORSKA, 2003).

Em um modelo *(Q)SAR* o efeito biológico de determinado composto, utilizado como variável dependente, pode ser representado por (i) medidas de atividade órgão-específica (ex. indução de certo citocromo); (ii) resultados de estudos experimentais, realizados com a finalidade de avaliar o comportamento de um composto em um sistema biológico ou no meio ambiente, ou ainda (iii) categorização de resultados de vários estudos experimentais, realizados sob diferentes protocolos, ou em espécies diferentes, mas que representam um mesmo *endpoint* (OECD, 2007).

Entende-se, como *endpoint*, em um modelo de *(Q)SAR*, a representação, contínua ou quantal, da atividade ou do efeito biológico relacionado a um determinado composto (OECD, 2007).

Vários modelos matemáticos podem ser utilizados para o estudo e construção da relação entre a estrutura química, expressa pelos descritores moleculares, e a atividade de determinado composto, representados pelos respectivos *endpoints*. Dentre eles, destacam-se os métodos de regressão linear múltipla, mínimos quadrados parciais (*PLS*) e as redes neurais artificiais (NETZEVA et al., 2005).

Depois de construído o modelo de *QSAR*, este deve ser, necessariamente, validado, ou seja, sua capacidade preditiva deve ser avaliada.

Alguns critérios estatísticos são utilizados na literatura (CONSONNI; BALLABIO; TODESCHINI, 2009; GRAMATICA, 2004; TROPSHA, 2010, GOLBRAIKH et al., 2003; LEONARD; ROY, 2006; MARTIN et al., 2012) para verificar a validade de um modelo de *(Q)SAR*.

Além de ser considerado válido pela sua capacidade preditiva, um modelo de *QSAR* deve também ser representativo da condição que deseja simular. Assim, o modelo *QSAR* gerado deve apresentar significância tanto estatística como, também, para a atividade ou efeito biológico que descreve.

A significância para o sistema biológico é alcançada quando o modelo consegue ter uma interpretação mecanística para a correlação observada entre os descritores moleculares e a atividade ou efeito biológico (DEARDEN; CRONIN; KAISER, 2010; OECD, 2007).

Adicionalmente, para determinar se uma predição para um composto pode ser feita com confiança, a abordagem de avaliação do domínio da aplicabilidade (DA) é geralmente utilizada (NETZEVA et al., 2005; ROBERTS; APTULA; PATLEWICZ, 2006; STANFORTH, 2007).

O DA expressa a necessidade de estabelecer o escopo e as limitações do modelo baseados nas informações estruturais, físico-químicas e da atividade ou efeito biológico, utilizados para a construção do modelo *(Q)SAR*. Predições que estão fora do DA são consideradas extrapolações e são menos confiáveis (OECD, 2007).

Muitas ferramentas computacionais (estudos *in silico*) têm sido aplicadas na análise e construção de modelos *(Q)SAR* para predição de toxicidade de compostos, entre elas alguns sistemas especialistas (*expert system*) (OECD, 2007).

De acordo com a OECD (2007), apenas um modelo de *(Q)SAR* ou outro sistema especialista considerado válido, ou seja, que tenha sua capacidade preditiva bem determinada e/ou estabelecida, pode ser utilizado para fins regulatórios.

Nessas condições, a abordagem de *(Q)SAR* pode ser aplicada em diversas áreas regulatórias, no desenvolvimento de novas moléculas, priorização de avaliação de compostos, na classificação e rotulagem de produtos e na avaliação do risco (Cronin; Livingstone, 2004; Kruhlak; Contrera, 2007).

No Brasil, a utilização regulatória de *(Q)SAR* para agrotóxicos ainda não foi regulamentada (BRASIL, 1992). Mas recomendações tem sido feitas para, complementarmente, auxiliar na avaliação de perigo de agrotóxicos, em especial na avaliação de produtos técnicos equivalentes.

A avaliação do perigo de agrotóxicos no Brasil é regulamentada pela Lei n. 7.802/89, seus principais Decretos regulamentadores, n. 4.074/02 e n. 5981/06, Portaria MS/SNVS n. 03/92 e Portaria Normativa IBAMA n. 84/96. Essa avaliação é feita com base na apreciação de estudos (eco)toxicológicos experimentais e, também, de estudos das propriedades físico-químicas do agrotóxico. Tais estudos dão suporte a classificação e rotulagem de agrotóxicos, bem como possibilitam a avaliação do risco destes produtos.

Define-se (BRASIL, 2002) como agrotóxicos, resumidamente, produtos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Um produto técnico é, conforme definição do mesmo Decreto, um produto obtido diretamente de matérias-primas por processo químico, físico ou biológico, destinado a obtenção de produtos formulados ou de pré-misturas, ou seja, que não pode ser utilizado diretamente nas lavouras, e cuja composição tenha teor definido de ingrediente ativo e impurezas, podendo conter estabilizantes e produtos relacionados, tais como isômeros (BRASIL, 2002).

Dentre os tipos de agrotóxicos avaliados sob a égide dessa legislação, destaca-se, quanto a necessidade de utilização da abordagem de *(Q)SAR*, o produto técnico equivalente. Esse se caracteriza por possuir uma forma de avaliação que requer menos estudos (eco)toxicológicos, do que aqueles exigidos para a um produto técnico propriamente dito (BRASIL, 2002).

Além de requerer menos estudos, a avaliação é feita em fases. Assim, os estudos são requeridos, a medida que são considerados necessários pelo avaliador, para a comparação com um produto técnico de referência, que já teve todos os estudos (eco)toxicológicos (BRASIL, 1992, 2002; IBAMA, 1996) avaliados sob a égide da Lei n. 7.802/89.

A necessidade de apresentação de menos estudos não deve significar, necessariamente, que produto técnico equivalente seja preterido em relação as questões de saúde e de meio ambiente (BRASIL, 2002). Pretende-se, deste modo, reduzir o sacrifício de animais de experimentação e os custos de registro, mantendo, no entanto, a segurança da população e do meio ambiente (LILIENBLUM et al., 2008). Concomitantemente, promove-se o aumento de oferta de produtos, assegurando a manutenção da produção agrícola.

Para garantir a mesma eficiência de avaliação (eco)toxicológica envolvendo, no entanto, uma redução do número de animais, estratégias de avaliação da toxicidade de

compostos devem ser desenvolvidas, visando propor alternativas viáveis e válidas que permitam substituir os estudos em animais por estudos *in vitro* ou *in silico*, como está sendo feito pela Comunidade Européia (EC) e EUA em seus respectivos programas de avaliação de substâncias químicas (EC, 2006; EPA, 1976).

Dentro dessas alternativas, destacam-se os métodos *in silico*, em relação aos métodos *in vitro*, por serem mais rápidos e de baixo custo, porém, não menos complexos.

De modo geral, os métodos *in silico* são desenvolvidos para prever a atividade biológica de determinado composto, em particular de sua toxicidade, considerando, fundamentalmente, que a atividade (ou resposta) biológica apresentada por um composto em um sistema biológico pode ser determinada por suas propriedades físico-químicas. Assim, conhecendo-se sua estrutura poder-se-ia, em princípio, conhecer sua atividade

Diversos métodos *in silico* baseados na aplicação de abordagens de *SARs*, de *QSARs* e de outros sistemas especialistas, foram propostos na literatura para avaliar a toxicidade de compostos (BENFENATI; BENIGNI, 2009; BENFENATI, 2007, 2007; BENIGNI et al., 2008; CASSANO et al., 2010; LAPENNA; WORTH, 2011; OECD, 2009; REUSCHENBACH; SILVANI, 2008). No entanto, pouco se publicou com relação à avaliação da equivalência entre produtos técnicos, mesmo sendo essa abordagem *in silico* já recomendada pela Comunidade Européia (2011). No Brasil, ainda, não foram definidas as formas de utilização e de avaliação desse tipo de produto por meio dessa abordagem.

Esse trabalho, tem como objetivo sumarizar as principais informações coletadas na literatura, referentes aos métodos *in silico* de modo a possibilitar sua aplicação na avaliação de perigo de um produto técnico equivalente.

Pretende-se, desta forma, fornecer subsídios para o entendimento das ferramentas *in silico* disponíveis, partindo da apresentação dos parâmetros que fundamentam a construção de um modelo estrutura-atividade, dos principais algoritmos utilizados, dos critérios para determinação de validade de um modelo (*SAR/QSAR*), de alguns sistemas especialistas citados na literatura, da aplicação regulatória. Com base nesse levantamento é feita uma proposição de um procedimento para utilização desses métodos para avaliação de produto técnico equivalente (um exemplo prático da aplicação do procedimento é apresentado no Apêndice A) e também são feitas duas tentativas de construção de modelo de (*Q*)*SAR*.

2 (Q)SAR E OUTROS SISTEMAS ESPECIALISTAS

Apresentamos a seguir, uma revisão de alguns métodos *in silico*, encontrados na literatura, utilizados para prever a toxicidade de determinado composto a partir do entendimento da relação entre sua estrutura química e correspondente resposta e/ou atividade biológica, por ele apresentada.

Para se entender o efeito que um determinado composto, descrito por sua estrutura molecular, exerce sobre um sistema biológico em particular, é necessário que se conheça a relação entre eles, descritas pelos respectivos descritores estruturais e biológicos. Essa relação pode ser estabelecida de modo qualitativo, denominada em inglês de *SAR*, *Structure Activity Relationship* ou de modo quantitativo denominada em inglês de *QSAR*, *Quantitative-Structure-Activity Relationship*. Juntas, são designadas como *(Q)SAR*.

De acordo com Dearden (1997 apud WORTH et al., 2011) um sistema especialista, do inglês *expert system*, é um sistema computacional (mas, não necessariamente) que pode ser usado para fazer previsões com base em uma informação prévia. Para Devillers e Devillers, (2009) um sistema especialista é um programa de computador que simula o julgamento humano. Cada sistema inclui uma base de conhecimento contendo experiência acumulada e regras definidas para aplicar essa base. Eles são desenhados para realizar tarefas específicas definidas em relação à essa informação acumulada.

Muitas publicações tem sido feitas para avaliar o desempenhos e particularidades dos sistemas especialistas e os mais citados serão brevemente apresentados no item 2.2. (BENFENATI, 2007; BENIGNI; BOSSA, 2008; BENIGNI et al., 2010; CRONIN; JAWORSKA, 2003; CRONIN; LIVINGSTONE, 2004; EC, 2010; HILLEBRECHT et al., 2011; KULKARNI; ZHU; BLECHINGER, 2005; WORTH et al., 2011, 2011; ZVINAVASHE; MURK; RIETJENS, 2008)

2.1 QSAR

Como mencionado anteriormente, *QSAR*, expressa, em uma equação matemática, a relação que pode existir entre a estrutura química de uma série de compostos e seus efeitos ou atividades (Netzeva *et al.*, 2005) Nessa relação as estruturas químicas são representadas pelos

descritores moleculares e o efeito biológico é representado pela quantificação dos efeitos ou atividades biológicas oriundos de estudos experimentais (GOLBRAIKH et al., 2003).

2.1.1 Descritores moleculares

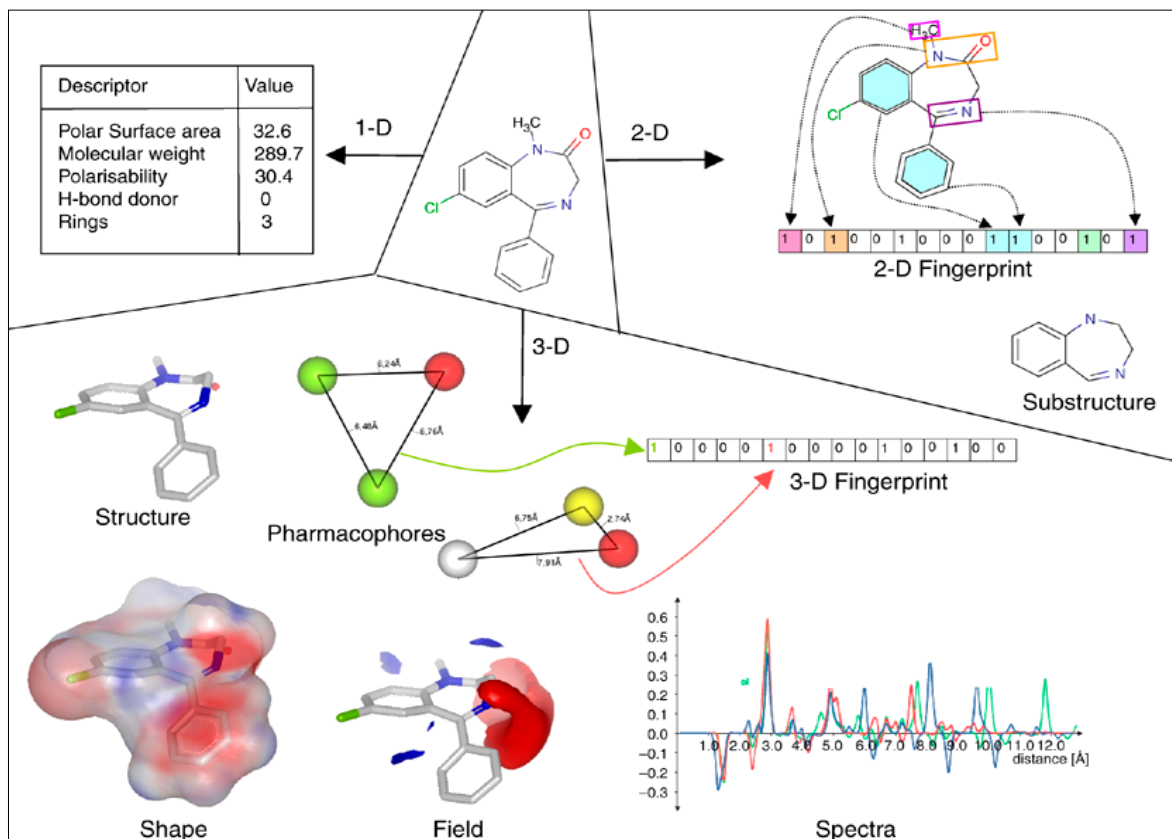
De acordo com a literatura, define-se descritor molecular como o resultado de um procedimento lógico e matemático que transforma uma informação química, codificada pela representação simbólica de um composto, em um número útil. Pode ser utilizado para a compreensão das propriedades moleculares e/ou para participar como variável independente de um modelo de predição para outras moléculas não contempladas no modelo. Podem ser construídos modelos de predição para comportamento e destino do composto no meio ambiente, propriedades físico-químicas e atividades biológicas (TODESCHINI; CONSONI, 2000).

Os descritores moleculares podem ser classificados de acordo com a dimensionalidade em (i) 1D até 2D e (ii) 3D (BENDER; GLEN, 2004). A complexidade dos descritores aumenta com o número de dimensões espaciais consideradas. Exemplos de alguns descritores moleculares estão apresentados na Figura 1 (ROGNAN, 2007).

Os descritores moleculares até a segunda dimensão, ou seja, 1D e 2D são fáceis de serem calculados e reproduzíveis, no entanto não consideram a flexibilidade conformacional, a estereoquímica e nem o tautomerismo do composto. Os descritores 1D podem ser derivados da fórmula química como, por exemplo, peso molecular, número de átomos, anéis ou ligações e área de superfície polar. Os descritores 2D, os topológicos, são os mais numerosos e utilizados, pois analisam os átomos conectados, ou seja, juntamente com suas ligações (ROGNAN, 2007).

A maior crítica aos descritores topológicos (2D) é relativa à sua inabilidade de expressar a estrutura molecular em 3D. O modelo gráfico de uma estrutura química descreve somente sua conectividade e não pode diferenciar confôrmeros (NIKOLOVA; JAWORSKA, 2003).

Figura 1 – Exemplos de alguns descritores moleculares 1D, 2D e 3D que podem ser utilizados para representar o composto 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-1,4-benzodiazepin-2(2H)-ona (diazepam - CAS número 439-14-5)



Fonte: (Rognan, 2007)

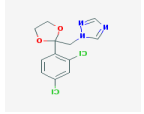
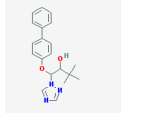
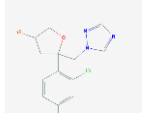
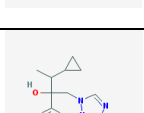
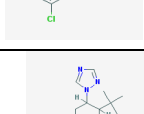
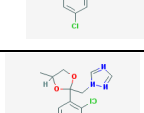
Uma das formas de representação da estrutura molecular bastante conhecida, utiliza a linguagem/notação *SMILES* – *Simplified Molecular Input Line Entry System*. Esse sistema de representação é utilizado como dado de entrada pela maioria dos *softwares* que calculam os descritores moleculares 2D, como *EDRAGON*, que possui versão gratuita disponível em www.vcclab.org/lab/edragon/ (Acesso em 19 de janeiro de 2013).

Está apresentado a seguir no Quadro 1, um exemplo de dados de entrada típica com as possíveis notações *SMILES* para alguns compostos. Essas notações podem ser geradas manualmente, a partir das estruturas moleculares ou por meio de *softwares* ou em bases de dados por meio de buscas simples pelo nome químico ou número *CAS* (*Chemical Abstract System*).

A notação *SMILES* é construída com base na representação linear dos átomos, ligações, ramificações, fechamento dos anéis e desconexões. Resumidamente, os átomos são

representados pelos seus símbolos correspondentes. As ligações simples, dupla e tripla são representadas pelos símbolos, “-“, “=” e “#”, respectivamente. As ramificações são tratadas entre parênteses. O fechamento dos anéis é representado pelo número 1 após os símbolos dos átomos onde o anel se inicia e termina, para possibilitar a linearização. As desconexões, que são a representação dos contra-íons são identificados, pelo símbolo “.” (DAYLIGHT, acesso em 17 de janeiro de 2013)

Quadro 1 – Exemplo das notações *SMILES* para alguns agrotóxicos, respectivamente, Azaconazol, Bitertanol, Bromuconazol, Ciproconazol e Difenonazol obtidos por meio do desenho de sua estrutura química no *software ACD/ChemSketch Freeware v. 12* e na base de dados *PUBCHEM*.

Nome comum (Nome químico)	Estrutura Química	CAS#	Fonte e Notações <i>SMILES</i> obtidas
Azaconazol (1-[[2-(2,4-diclorofenil)-1,3-dioxolan-2-il]metil]-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol)		60207-31-0	<i>ACD/Labs:</i> <chem>Clc1cc(Cl)c(cc1)C2(OCCO2)Cn3ncnc3</chem> <i>Pubchem:</i> <chem>C1COC(O1)(CN2C=NC=N2)C3=C(C=C(C=C3)Cl)Cl</chem>
Bitertanol (β-([1,1'-bifenil]-4-iloxi)-α-(1,1-dimetiletil)-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-etanol)		55179-31-2	<i>ACD/Labs:</i> <chem>O(c2ccc(c1ccccc1)cc2)C(n3ncnc3)C(O)C(C)(C)C</chem> <i>Pubchem:</i> <chem>CC(C)(C)C(C(N1C=NC=N1)OC2=CC=C(C=C2)C3=CC=CC=C3)O</chem>
Bromuconazol (1-[[4-bromo-2-(2,4-diclorofenil)tetrahidro-2-furanil]metil]-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol)		116255-48-2	<i>ACD/Labs:</i> <chem>BrC1CC(OC1)(c2c(Cl)cc(Cl)cc2)Cn3ncnc3</chem> <i>Pubchem:</i> <chem>C1C(COC1(CN2C=NC=N2)C3=C(C=C(C=C3)Cl)Cl)Br</chem>
Ciproconazol (α-(4-clorofenil)-α-(1-ciclopropiletil)-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-etanol)		94361-06-5	<i>ACD/Labs:</i> <chem>Clc1ccc(cc1)C(O)(C(C)C2CC2)Cn3ncnc3</chem> <i>Pubchem:</i> <chem>CC(C1CC1)C(CN2C=NC=N2)(C3=CC=C(C=C3)Cl)O</chem>
Diclobutrazol (αR,βR)-rel-β-[(2,4-diclorofenil)metil]-α-(1,1-dimetiletil)-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-etanol)		75736-33-3	<i>ACD/Labs:</i> <chem>Clc1ccc(c(Cl)c1)CC(n2ncnc2)C(O)C(C)(C)C</chem> <i>Pubchem:</i> <chem>CC(C)(C)C(C(CC1=C(C=C(C=C1)Cl)Cl)N2C=NC=N2)O</chem>
Difenoconazol (1-[2-[2-cloro-4-(4-clorofenoxi)fenil]-4-metil-1,3-dioxolan-2-ilmetil]-1 <i>H</i> -1,2,4-triazol)		119446-68-3	<i>ACD/Labs:</i> <chem>Clc4ccc(Oc1ccc(c(Cl)c1)C2(OCC(O2)C)Cn3ncnc3)</chem> <i>PubChem:</i> <chem>CC1COC(O1)(CN2C=NC=N2)C3=C(C=C(C=C3)OC4=CC=C(C=C4)Cl)Cl</chem>

Fonte: ACD/Labs ChemSkecht Freeware v.12 e base de dados da <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/> (Acesso em 17 de janeiro de 2013)

Um dos tipos de descritor molecular 3D muito utilizado considera os Campos de Interação Moleculares gerados de um composto, denominado em inglês, *Molecular Interaction Fields (MIF)*. Estes, quando são utilizados para construção do modelo relacionam as variações eletrostáticas e estéricas no espaço com as variações na atividade biológica (*3D-QSAR*). As abordagens mais utilizadas são *Comparative molecular field analysis (CoMFA)* e *Comparative molecular similarity indices analysis (CoMSIA)*. *CoMFA* se baseia na análise do campo molecular detectado por um *probe atom* e mapeado em uma grade. Na abordagem *CoMSIA*, os campos moleculares são expressos na forma de uma função tipo Gaussiana. Para tentar representar a contribuição entrópica da ligação receptor-ligante e campos eletrostáticos, considera também o parâmetro hidrofóbico (COSTANZI; TIKHONOVA, 2009).

2.1.2 Parâmetro Biológico

O outro parâmetro para a construção de um modelo *QSAR* é o parâmetro que expressa a atividade biológica. Segundo Worth et al. (2011), o parâmetro biológico é a representação, quantal ou quantitativa, de uma alteração causada por um composto ao sistema biológico. Os parâmetros biológicos podem ser representados por uma categoria, como por exemplo, sim/não, tóxico/não tóxico e/ou obtidos quantitativamente, quando são representados por valores numéricos.

Dados biológicos de diferentes tipos tem sido usados em (*Q*)*SAR* como por exemplo, valores de atividade biológica obtidos por estudos *in vitro* e *in vivo*, de constantes de inibição e de velocidade de associação/dissociação (KUBINYI, 1993).

Todos esses dados podem ser usados, desde que sejam expressos na escala correta. Isso significa que todos os dados biológicos devem ser transformados corretamente e de forma adequada antes de serem usados na construção do modelo *QSAR*. Ainda, considerando a característica não linear da relação dose-resposta biológica, a porcentagem de efeito determinada em uma única dose não deve ser utilizada na construção de um modelo *QSAR*. Nesse caso, as doses devem ser transformadas em doses molares equi-efetivas, por exemplo, em um determinado valor da dose que produz um certo efeito ou causa a morte de uma porcentagem de animais. (KUBINYI, 1993).

Para a utilização na construção de um modelo de *QSAR* todos os valores de atividade biológica devem ser transformados na escala logarítmica. Por convenção, o

logaritmo negativo da dose(C) é utilizada ($\log 1/C$), pois possibilita a representação de valores maiores para compostos mais ativos. Outro motivo para utilização da escala logarítmica é a necessidade de que o erro experimental do parâmetro biológico tenha uma distribuição normal, para que a análise de regressão possa ser aplicada. (KUBINYI, 1993).

Na área da Toxicologia, o termo *endpoint* tem sido frequentemente utilizado por reguladores para designar o efeito biológico de interesse em um estudo experimental (OECD, 2007). Por exemplo, em um estudo para determinar a possibilidade de um composto causar câncer em uma determinada espécie animal, mesmo que o animal apresente outro efeito biológico, o resultado de interesse ou o *endpoint* é o câncer.

Na abordagem (*Q*)SAR, de acordo com a OECD (2007), um *endpoint* pode ser um efeito biológico ou uma propriedade físico-química, se estes forem os resultados esperados de um modelo preditivo. O estabelecimento da relação com uma propriedade físico-química é chamada de *Quantitative Structure Property Relationship- QSPR* (OECD, 2007).

Para a utilização de valores de atividade biológica ou *endpoint* na construção de um modelo (*Q*)SAR algumas considerações devem ser feitas com relação a forma e a qualidade do dado. Esses itens serão discutidos no item 3, dentro do primeiro princípio de validação da OECD, relativo a definição de um *endpoint*.

2.1.3 Construção de um modelo de QSAR

Atualmente, o avanço das técnicas computacionais permite a realização de cálculos cada vez mais complexos e em poucos segundos. Concomitantemente, as técnicas estatísticas permitem que novos modelos sejam construídos e que mais descritores moleculares sejam utilizados. Inúmeros descritores moleculares tem sido desenvolvidos com o intuito de representar cada vez mais a complexidade da estrutura molecular e, assim, obter mais informações capazes de modelar a predição da atividade biológica e/ou da resposta físico-química (TODESCHINI, 2002).

O aumento do número de descritores em um modelo possibilita a descrição mais precisa da estrutura molecular. No entanto, quanto maior o número de descritores moleculares mais difícil será interpretar sua relação com o efeito biológico (CRONIN; LIVINGSTONE, 2004).

A construção de um modelo de *QSAR* envolve a análise estatística das possíveis relações entre determinada propriedade biológica e os descritores moleculares de uma série de compostos. Essa análise é realizada aplicando-se métodos matemáticos e/ou estatísticos adequados para explicar a relação e, quando possível, fazer a predição de propriedades biológicas de compostos (TICHÝ, 2005).

Na literatura, Unger e Hansch (1973) formularam regras para a obtenção de modelos válidos que, por sua generalidade, foram revistos anteriormente (KUBINYI, 1993a), apresentados no grupo (PIRES, 1998; SCOTTI, 2005) e, sumarizados com algumas alterações, a seguir:

- (i) Para a seleção de variáveis independentes, uma grande faixa de diferentes parâmetros devem ser testados, como por exemplo, $\log P$ ou π , σ , MR e parâmetros estéricos. Parâmetros obtidos por cálculos de orbitais moleculares e variáveis indicadoras (0 ou 1) não devem ser superestimados. Topliss verificou que as chances de obter um coeficiente de correlação maior que 0,9, não só aumentavam com o número de variáveis incluídas na equação, mas, também, com o número de variáveis das quais as diferentes combinações são selecionadas (TOPLISS & COSTELLO, 1972; TOPLISS & EDWARDS, 1979);
- (ii) Os parâmetros selecionados para a “melhor equação” devem apresentar correlação não significativa (ou seja, o coeficiente de intercorrelação r deve ser menor do que 0,6 – 0,7. Exceções são combinações dos termos lineares e quadráticos como $\log P$ e $(\log P)^2$, os quais são geralmente altamente intercorrelacionados, com $r > 0,9$) (KUBINYI, 1993);
- (iii) Justificativa deve ser dada para a escolha das variáveis independentes. Todos os parâmetros devem ser validados pela análise de regressão que é um procedimento estatístico adequado. A melhor equação é geralmente aquela com o mais baixo desvio padrão e, com todos os termos significantes (indicado pelos intervalos de confiança de 95% ou pelo teste seqüencial F). Alternativamente, a equação com o maior valor de F pode ser selecionada como a melhor equação;
- (iv) Havendo mais de uma equação (aproximadamente) com mesmo nível de confiança estatística, a mais simples com menos parâmetros deve ser escolhida;

- (v) Não muitas variáveis devem ser incluídas no modelo final. Deve-se ter no mínimo 5 a 6 compostos por variável para se evitar correlações ao acaso. No entanto, essa regra se aplica apenas a série de compostos de tamanho intermediário. Para séries pequenas mais parâmetros podem ser permitidos desde que estejam baseados em um modelo razoável. Para grandes séries ($n > 30$), essa recomendação leva a equações que incluem muitas variáveis, nas quais a regressão linear múltipla (*MLR*), válida para o modelo de Hansch, tornou-se inadequada, aumentando assim, as chances de se propor um falso modelo com um bom ajuste, ou seja, não se obtém uma correlação verdadeira, mas sim apenas uma coincidência (TOPLISS & COSTELLO 1972; TOPLISS & EDWARDS 1979);
- (vi) Para modelos qualitativos é mais importante que ele seja consistente com o mecanismo de ação (processo físico-químico-biológico).

As regras e as condições mencionadas foram, então, revistas e reformuladas por Kubinyi (1994) para se obter correlações válidas. De acordo com as novas propostas, recomendou-se que :

variáveis significativas devem ser selecionadas;

- (i) a correlação e cada termo individual no modelo de regressão deve ser justificado por critérios estatísticos apropriados;
- (ii) para resultados semelhantes, o modelo com um menor número de variáveis deve ser escolhido; e
- (iii) não muitas variáveis devem ser incluídas no modelo final.

O processo de desenvolvimento de um modelo *QSAR* pode ser geralmente dividido em três etapas: (i) preparação dos dados, (ii) análise dos dados e (iii) validação do modelo. Estas etapas representam um procedimento padrão e são determinadas de acordo com o interesse, experiência e disponibilidade de *softwares* (GOLBRAIKH et al., 2003).

2.1.3.1 Preparação dos dados

Essa etapa inclui a seleção dos compostos que serão modelados, o cálculo dos descritores moleculares e a escolha da abordagem estatística que será utilizada na construção do modelo.

Geralmente, os compostos são selecionados considerando a necessidade de informações adicionais sobre um grupo, ou uma classe de compostos químicos. Os modelos de *(Q)SAR*, assim obtidos, tem aplicação restrita àquela classe que está sendo estudada, pois tem o propósito de fazer previsões apenas para uma determinada atividade biológica, ou um determinado mecanismo ou modo de ação específico (NETZEVA, 2005).

Os modelos de *(Q)SAR* utilizados no ambiente regulatório são, geralmente, gerados com compostos não congêneres. Estes tentam representar a relação de estrutura-atividade para um domínio químico amplo e, muitas vezes, não refletem a atividade com base em um único mecanismo de ação. Isso implica na utilização de ferramentas estatísticas que tentam estabelecer um padrão de estrutura química ou atividade que transcendem as diferenças mecanísticas (CHAUDHRY et al., 2010).

A abordagem estatística deve ser escolhida com base no número de descritores calculados e nas suas respectivas relações com a atividade biológica, conforme pode ser observado a seguir.

2.1.3.2 Análise dos dados

Inclui a construção e o estudo da relação existente entre os descritores moleculares e a atividade biológica, ou seja, a escolha do algoritmo.

De acordo com a OECD (2007) os algoritmos comumente utilizados para a construção de modelos *(Q)SAR* são :

a) Regressão Linear Univariada (ULR) – também chamada de regressão linear simples, envolve somente uma variável dependente (y) e uma independente(x) para modelar uma relação simples entre um descritor e um endpoint e assume a relação como uma linha reta (CHATTERJEE; PRICE, 1977; OECD, 2007).

b) Regressão Linear Múltipla (MLR) – envolve a utilização de mais de um descritor, que podem ser selecionados por diversas abordagens, para a predição de um endpoint. Por

utilizar mais de um descritor, pode sofrer *overfitting* devido a utilização de variáveis correlatas, afetando assim sua preditividade (OECD, 2007).

c) Análise dos Componentes Principais (PCA) e Regressão dos Componentes Principais (PCR) – *PCA* é uma técnica para reduzir dimensões e é baseada na combinação linear de variáveis. *PCR* é obtido de um modelo reduzido, negligenciando alguns componentes do *PCA* das variáveis independentes (*x*) e relacionando os principais componentes mantidos das variáveis dependentes (*y*). Os componentes negligenciados são usualmente influenciados por informações não relevantes dos dados. Em *PCA* é difícil identificar *outliers* e o modelo pondera indefinidamente estes pontos de dados (NIEMI, 1990; KAISER; ESTERBY, 1991).

d) Mínimos Quadrados Parciais (PLS) (Wold et al. 1984, 1993) – é uma combinação entre *MLR* e *PCR*. Tenta explicar a variância das variáveis independentes e também tenta obter uma boa correlação entre as variáveis dependentes e independentes. É útil quando existe colinearidade dos descritores.

e) Rede Artificial Neural (ANN) (Lek and Guegan, 1999) – é uma abordagem muito utilizada em várias áreas como padrão de reconhecimento, análise de processos e modelagem não linear (ANZALI et al., 1998; ZUPAN AND GASTEIGER, 1999), classificação de objetos em classes toxicológicas ou modos de ação tóxica (SPYCHER et al., 2005), seleção de descritores relevantes e divisão da série total original em clusters (VRACKO, 2005).

f) Agrupamento difuso (Fuzzy clustering) e regressão (FRIEDERICHS et al., 1996) – são técnicas capazes de lidar com probabilidade de objetos achados pertencentes a certas classes, ao invés de classificar como decisões sim/não.

g) Agrupamento pela Vizinhança Mais Próxima (KNN) – determina a classe de um objeto avaliando a classe de um número mais próximo da vizinhança do objeto. A maioria faz ponderações com relação à distância entre pontos determinados.

h) Algoritmo Genético (GA) (Forrest, 1993) – é um algoritmo baseado na teoria da evolução. Não procura por uma solução única, mas mantém centenas de ‘talvez’ para solução referente a uma população e tenta aumentar a adequabilidade dessa população a cada geração.

Cada solução é avaliada e, se descartada, é movida para uma próxima solução. Esse processo é feito várias vezes com diferentes combinações.

E, finalmente, a terceira e última etapa no desenvolvimento de um modelo *QSAR* envolve uma etapa extremamente importante, ou seja, a validação do modelo.

2.1.3.3 Validação do modelo:

Determina a habilidade do modelo em prever a atividade biológica de compostos ainda não testados. Pode ser dividida em duas partes, a validação interna, quando a preditividade é avaliada com compostos pertencentes ao modelo construído e a validação externa, quando se avalia a preditividade de compostos não utilizados para a construção do modelo.

Para a validação interna, a maioria dos métodos utilizam o procedimento de validação cruzada *Leave-One-Out (LOO)* (ou *Leave-Some/Many-Out-LSO* ou *LMO*) onde um ou vários compostos são retirados do modelo para que se possa avaliar a perturbação causada na preditividade por esta retirada (OECD, 2007). O resultado desse procedimento de validação cruzada é o R^2 (Q^2), que é comumente entendido como o critério de robustez ou preditividade interna do modelo (GOLBRAIKH et al., 2003).

Outro método frequentemente utilizado para também estabelecer esse critério é a chamada de *y-randomização*, que consiste em repetir várias vezes o procedimento de cálculo com as variáveis dependentes trocadas aleatoriamente e avaliar as resultantes estatísticas. Esse procedimento verifica se não existem relações ao acaso. (GOLBRAIKH et al., 2003).

O *bootstrap resampling* é outro método de validação interna que consiste em dividir o conjunto de dados em grupos várias vezes para simular o que acontece com o modelo quando as amostras (ou compostos) são selecionados randomicamente. Baseia-se na premissa de que o conjunto de dados deve ser representativo da população do qual ele foi tirado (OECD, 2007).

Tropsha (2010) recomenda um conjunto de critérios estatísticos que devem ser satisfeitos para um modelo ser considerado preditivo. Para *QSAR* que utilizam dados contínuos de atividade/propriedades os seguintes critérios devem ser avaliados:

- a) coeficiente de correlação (R): medida estatística da relação entre a variável dependente (y) e a variável independente. Quanto mais próximo da unidade maior o ajuste estatístico de um modelo baseado em uma regressão. Um R próximo de 0 significa que as variáveis não estão relacionadas (GRAMATICA, 2004);
- b) coeficiente de correlação da validação cruzada (Q^2): medida da variância do modelo obtida na validação cruzada (GRAMATICA, 2004). Um $Q^2 > 0,5$ é necessário, mas não suficiente para um modelo ser considerado preditivo (GRAMATICA, 2004; TROPSHA, 2010);
- c) coeficientes de determinação (R^2 , R_0^2 , $R_0^{2'}$): medidas estatísticas que medem a quantidade de variação de y explicada pela regressão. Explica a variância do modelo e é uma medida de *goodness-of-fit* (Gramatica, 2004). R_0^2 , $R_0^{2'}$ medem , respectivamente, a variação do valor predito *versus* observado e do valor observado *versus* observado da regressão através da origem. Um valor de $R^2 > 0,6$ é um dos critérios para considerar um modelo válido, assim como as razões $(R_0^2 - R_0^2) / R^2$ e $(R_0^2 - R_0^{2'}) / R^2$ devem ser menores que 0,1 e $|R_0^2 - R_0^{2'}| < 0,3$ (TROPSHA, 2010);
- d) inclinações da regressão através da origem (k e k'): as inclinações calculadas devem estar dentro do intervalo de 0,85 e 1,15 (TROPSHA, 2010).

É importante enfatizar que apenas a validação interna do modelo não é suficiente para considerar um modelo válido, mesmo alcançando alto valor de Q^2 . O poder de preditividade de um modelo (Q)SAR somente pode ser estabelecido por sua validação externa, que é a avaliação da capacidade do modelo em fazer predições para compostos que não foram utilizados na construção do modelo (TROPSHA, 2010).

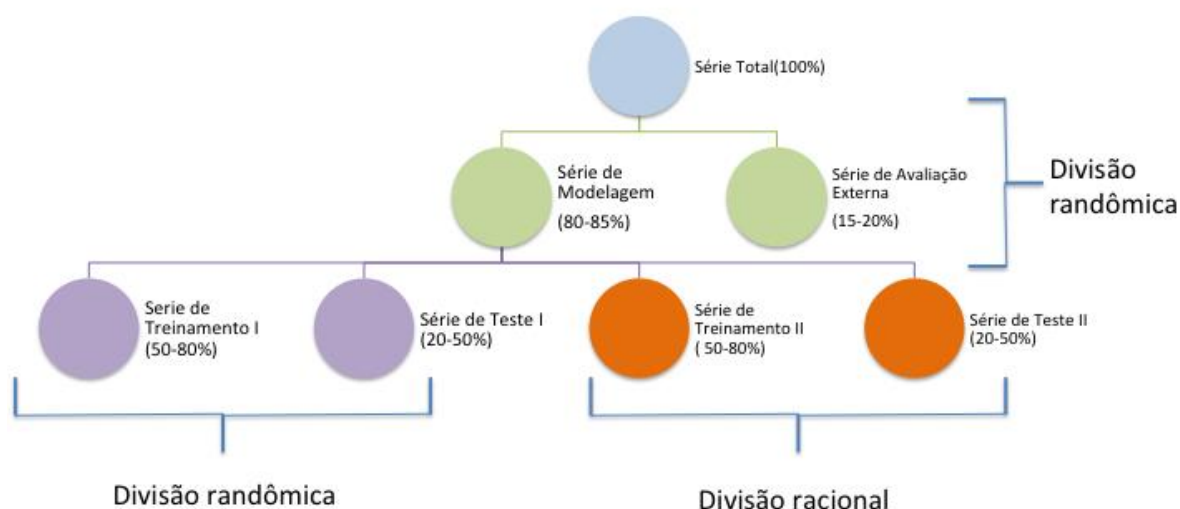
Para realizar a validação externa de um modelo é necessário que se divida os compostos de estudo em duas séries: série de treinamento e série de teste. A série de treinamento é o conjunto de compostos utilizados para a construção do modelo. A série de teste será o conjunto de compostos que serão utilizados para validar o modelo, ou seja, os que avaliarão o poder preditivo de compostos não incluídos ao modelo original. Existem muitas publicações sobre como dividir os compostos nesses dois tipos de séries (DEBELJAK et al., 2005; GOLBRAIKH; TROPSHA, 2002; GOLBRAIKH et al., 2003; LEONARD; ROY, 2006; MARTIN et al., 2012).

Essa divisão da série de compostos pode ser feita (i) aleatoriamente; (ii) ordenando os valores da atividade biológica ou; (iii) racionalmente, por meio de métodos estatísticos baseados no cálculo de similaridade dos compostos. Os métodos estatísticos mais utilizados incluem *Kohonen Self-Organizing Map*, método *Kennard-Stone*, *D-optimal design*, *D-optimal onion design* e o método *sphere exclusion*. Martin et al. (2012) verificaram que a divisão racional, ou seja, a divisão por métodos estatísticos, pode melhorar a preditividade do modelo, devido ao aumento da similaridade dos compostos na série de treinamento. No entanto, a divisão aleatória ou randômica também pode ser utilizada.

Atualmente, muitos modelos (*Q*)SAR ainda são construídos para que se possa escolher o melhor modelo. Essa escolha está sendo feita considerando o modelo que alcança maior confiança estatística para a série teste. Entretanto, de acordo com Golbraikh e Tropsha (2002); Tropsha (2010) e Martin et al. (2012), esse critério de escolha deconsidera o que rotineiramente se considera uma validação externa adequada, por não garantir que um modelo selecionado dessa forma realmente fará previsões acuradas, ou seja, prever a atividade de compostos realmente externos ao conjunto de dados (TROPSHA, 2010).

Com base nessas considerações, Martin et al. (2012) propuseram um esquema (Figura 2) para divisão das séries, onde a série total, que é o conjunto de dados disponíveis, fosse dividida em duas etapas. Numa primeira etapa, a série total seria dividida em uma série chamada de série de modelagem, definida pelo conjunto de compostos que seriam utilizados, inicialmente, na construção do modelo e, uma segunda série chamada de série de avaliação externa, definida pelo conjunto de compostos com atividade biológica conhecida com a função de realizar uma segunda avaliação da capacidade preditiva do modelo. Numa segunda etapa, a série de modelagem seria dividida em série de treinamento e série de teste (TROPSHA, 2010). Nessa última etapa a seleção do melhor modelo seria feita de dois modos, ou seja, aleatório ou racional, resultando nas respectivas séries de treinamento e de teste.

Figura 2 - Esquema do procedimento sugerido para divisão dos compostos em séries para a construção e para a validação de um modelo (*Q*)SAR e as respectivas porcentagens de compostos, geralmente, incluídos em cada série, de acordo com Tropsha (2010) e Martin et al. (2012).



Fonte: Adaptado de Martin et al (2012) e Tropsha (2010).

2.2 SAR

SAR pode ser definida como o estabelecimento da relação qualitativa entre determinado composto, expressa por sua estrutura ou sub-estrutura, e correspondente resposta, efeito biológico, ou capacidade de modular um efeito biológico transmitida por outra sub-estrutura. O termo subestrutura se refere a um átomo, ou a um conjunto de átomos adjacientemente conectados, em uma determinada molécula. Uma subestrutura associada à presença de uma determinada resposta ou atividade biológica é chamada de alerta estrutural (WORTH et al., 2011).

Adicionalmente, *SAR* pode ser baseado no conjunto de características estéricas e eletrônicas de um composto, consideradas necessárias para garantir e estabelecer interações com determinado alvo biológico resultando no aparecimento de um determinado efeito biológico específico (BENFENATI, 2007; WORTH et al., 2011).

Geralmente, *SAR* está baseada no conhecimento obtido nas áreas de química, farmacologia e toxicologia. Seu poder preditivo é determinado pela avaliação retrospectiva e periódica de todos os grupos de compostos avaliados no domínio regulatório (OECD, 2007), ou seja, sua *performance* é avaliada com base em resultados confirmados experimentalmente.

Muitas vezes, a variabilidade biológica experimental é muito grande para se ter uma predição quantitativa. Nesses casos, os compostos podem ser classificados, em uma ou mais categorias de efeito biológico (por exemplo, tóxico/não tóxico, mutagênico/não mutagênico) para possibilitar a sua rotulagem de acordo com o seu perigo (OECD, 2007).

Modelos de *SAR* de classificação (CM) podem ser construídos usando vários métodos estatísticos. Entre os métodos apropriados para o desenvolvimento de modelos de classificação lineares estão análise discriminante multivariada, regressão logística e árvores de decisão ou classificação. Para os modelos associados com limites não-lineares podem ser utilizadas os métodos de *clusters*, rede neural e *K-NN* (OECD, 2007).

O *goodness-of-fit* de um CM pode ser avaliado por meio da estatística de Cooper, nomeadamente: sensibilidade, especificidade e concordância (acurácia), razão de preditividade positiva/negativa e razão de falsos positivos/negativos, calculados com base em uma matriz 2x2 de contigência (Quadro 2). As definições de cada critério podem ser vistas no Quadro 3. A estatística de Cooper deve ser, significativamente maior, do que um limite pré-definido. O limite é tipicamente maior do que 50%, mas percentagens mais baixas podem ser aceitáveis se a ênfase está na razão de preditividade de positivos/negativos ao invés da razão entre sensibilidade/especificidade (WORTH et al., 2011).

A habilidade de classificação de um CM depende de como o conjunto de dados é usado. Para medir a variabilidade associada com as classificações é necessário estimar o intervalo de confiança (IC) da estatística de Cooper. O método de *bootstrap resampling* pode ser utilizado com esta finalidade (OECD, 2007).

Para checar o *overfitting* do modelo, alguns *softwares* de estatística podem ser utilizados, no entanto, o usuário deve ter conhecimento sobre regras de diagnóstico e sobre os métodos fundamentais para interpretar a estatística produzida. Nesse caso um item importante é a transparência do *software* utilizado, no entanto, ainda não existe definição sobre o quão transparente ele deve ser (OECD, 2007).

Quadro 2 - Matriz de contingência (2x2) utilizada na avaliação de preditividade de modelos de classificação por meio da estatística de Cooper (Quadro 3). “a”, “b”, “c” e “d” são os números de compostos com classe observada (Ativo/Não ativo) que tiveram uma classe atribuída (Tóxico/Não Tóxico) e os seus totais.

		Classe Atribuída		
		Tóxico	Não Tóxico	Total
Classe observada (<i>in vivo</i>)	Ativo	a	b	a+b
	Não ativo	c	d	c+d
	Total	a+c	b+d	a+b+c+d

Fonte: Adaptado OECD(2007)

Quadro 3 - Nome dos critérios estatísticos, equações para cálculo e definições utilizadas na estatística de Cooper calculada com a utilização de uma matriz de contingência (Quadro 2) para validação de modelos de classificação.

Critério Estatístico	Equações	Definição Utilizadas
Sensibilidade(razão de positivos verdadeiros)	$a/(a+b)$	Fração de compostos ativos corretamente classificados
Especificidade (razão de negativos verdadeiros)	$d/(c+d)$	Fração de compostos não ativos corretamente classificados
Concordância ou acurácia	$(a+b)/(a+b+c+d)$	Fração de compostos corretamente classificados
Preditividade positiva	$a/(a+c)$	Fração de compostos corretamente classificados como ativos pelos compostos classificados como tóxicos
Preditividade negativa	$b/(b+d)$	Fração de compostos corretamente classificados como não ativos pelos compostos classificados como não tóxicos
Razão de falsos positivos	$c/(c+d)$ 1-especificidade	Fração de compostos classificados como não ativos que foram erroneamente classificados como tóxicos
Razão de falsos negativos	$b/(a+b)$ 1-sensibilidade	Fração de compostos classificados como ativos que foram erroneamente classificados como não tóxicos

Fonte: OECD (2007)

2.3 Sistemas Especialistas

Os métodos descritos anteriormente subsidiam esta última abordagem apresentada. Os Sistemas Especialistas podem ser gratuitos ou comercialmente disponíveis. Quando gratuitamente disponíveis são fomentados por organizações internacionais que pretendem uniformizar as tomadas de decisão com base na reprodutibilidade de resultados, tornando, assim, a avaliação mais transparente possível. Na literatura, observa-se que a transparência é a principal crítica aos sistemas comerciais (ECETOC, 2003; ECHA, 2008).

Os sistemas especialistas se fundamentam em três principais abordagens de construção do modelo (Q)SAR: (i) baseado em regras, (ii) baseado em estatística e (iii) método híbrido (WORTH et al., 2011).

(i) Sistemas baseados em regras : Contém a regra “*se então*” que combina o conhecimento em toxicologia oriundo da literatura, julgamento especializado e lógica difusa (*fuzzy logic*). Exemplos de *softwares* baseados em regras são *Derek for Windows* (nova versão designada *Derek Nexus* de https://www.lhasalimited.org/derek_nexus/#Development_of_Expert_Knowledge_Rules_in_Derek_Nexus%3A), *HazardExpert*, *OECD (Q)SAR ToolBox* e *ToxTree*. Geralmente *Derek Nexus* e *HazardExpert* podem ser usados conjuntamente com seus respectivos programas suplementares *Meteor* e *Metabolexpert* para prever o potencial de toxicidade e carcinogenicidade dos metabólitos tão bem quanto dos compostos de origem (parentais). Alguns autores (WORTH et al., 2011) consideram o *ToxTree* um sistema híbrido por utilizar modelos de QSAR como suplemento às regras.

HazardExpert é um *software* para estimar inicialmente os sintomas tóxicos de compostos orgânicos em animais e em humanos. Considera a biodisponibilidade, por meio dos dados de pK_a e de $\log P$, a bioacumulação, a predição de toxicidade dos metabólitos e , ainda, permite a edição de fragmentos tóxicos (<http://www.compudrug.com/?q=node/35>).

OECD (Q)SAR ToolBox e *ToxTree* são *softwares* livres subsidiados, respectivamente, pela OECD e pelo *Institute for Health and Consumer Protection – IHCP* da EC. O *ToolBox* foi criado com o objetivo de ser usado pelo governo, pela indústria e outros interessados para o preenchimento de dados de (eco)toxicidade ainda não disponíveis , com a finalidade de avaliar o perigo de compostos. Incorpora várias informações e ferramentas de

várias fontes, em um fluxo de trabalho lógico. Um dos pontos cruciais para o fluxo lógico é o agrupamento de compostos em categorias químicas. Os atributos iniciais do *Toolbox* são os seguintes:

- (a) identificação das características estruturais relevantes e o potencial mecanismo, ou modo de ação, de um composto alvo (*target chemical*), que no contexto do *ToolBox*, é o composto ao qual se deseja fazer a predição.
- (b) identificação de outro composto que tem a mesma característica estrutural e/ou mecanismo ou modo de ação;
- (c) uso dos dados experimentais existentes para preencher os dados não disponíveis.

Em 2012, foi lançada uma nova versão que incluiu outras fontes de dados. Houve o aprimoramento da engenharia de pesquisa, inserção de novos esquemas de formação de perfis mecanísticos específicos para alguns *endpoints*, predição de toxicidade de misturas quantitativas, predição do conjunto tautomérico, predição considerando o metabolismo e simulação de auto-oxidação e de hidrólise (<http://www.oecd.org/chemicalsafety/assessmentofchemicals/theoecdqsartoolbox.htm>).

ToxTree é um aplicativo que classifica os compostos de acordo com categorias e prediz vários tipos de *endpoints* toxicológicos aplicando várias árvores de decisão, disponíveis na literatura (BENIGNI et al., 2008; LAPENNA; WORTH, 2011; PATLEWICZ et al., 2008).

(ii) Sistemas baseados em estatísticas: Usam uma variedade de métodos estatísticos, regras de indução, inteligência artificial e técnicas de reconhecimento de padrões, para construir um modelo, usualmente para base de dados de compostos não congêneres. Incluem os *softwares* comerciais *MultiCASE* (<http://www.multicase.com>, acesso em 21 de janeiro de 2012) e *TOPKAT* (<http://accelrys.com/products/discovery-studio/admet.html>, acesso em 21 de janeiro de 2012), e os modelos disponíveis gratuitamente *Lazar* e *CAESAR*.

Resumidamente, o sistema *MultiCASE* utiliza uma série de aprendizagem, *learning set*, para a construção da série de treinamento. Essa aprendizagem é baseada na presença de fragmentos estruturais relacionados à uma atividade. Com base nessa busca de fragmentos relacionados à uma determinada atividade, ele cria uma lista de compostos que possuem o

alerta estrutural reconhecidos como ativos e que ele entende ser a série de treinamento que será utilizada para a predição de toxicidade (ECETOC, 2003).

O sistema *TOPKAT* usa equações de regressão múltipla linear para *endpoints* contínuos como DL_{50} , CL_{50} ou *LOAEL* (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) e funções discriminantes como mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade. Para cada modelo, existe um conjunto de descritores moleculares associados ao *endpoint* escolhido que influenciam a estimativa e são importantes para determinar se o composto submetido está dentro do espaço ótimo de predição (*Optimum Prediction Space OPS*) (ECETOC, 2003).

Lazar é um sistema que usa abordagem do *k-Nearest Neighbourhood (k-NN)*, um método de classificação de objetos, para prever *endpoints* de um composto com base em uma série de treinamento baseada em fragmentos estruturais. Pode também utilizar o método da regressão, se as atividades forem valores contínuos. Usa similaridade como base para suas predições e avalia a confiança para cada predição, por meio do índice de confiança (HELMA, 2006).

CAESAR (*Computer Assisted Evaluation of industrial chemical Substances According to Regulations*) é um projeto patrocinado pela Comunidade Européia (EC) dedicado ao desenvolvimento de modelos *QSAR*. Possui cinco modelos já desenvolvidos para os seguintes *endpoints*: fator de bioconcentração, sensibilização dérmica, carcinogenicidade, mutagenicidade e, toxicidade ao desenvolvimento. Todos os modelos geram dados sobre o domínio de aplicabilidade do modelo com relação a predição do *endpoint* escolhido (<http://www.caesar-project.eu> Acesso em 18 de janeiro de 2013)

(iii) Modelos híbridos: São baseados na combinação dos sistemas baseado em regras (conhecimento) com o baseado em estatística. São baseados na idéia geral que um único alerta estrutural representa um único mecanismo de interação e os modelos derivados da estatística podem, quantitativamente, prever a variação da reatividade do alerta relacionado ao restante da estrutura molecular. Exemplo de modelo híbrido é o implementado na plataforma *OASIS TIMES*. Informações mais detalhadas sobre essa plataforma podem ser obtidas no site <http://oasis-lmc.org/?section=software&swid=4> (Acesso em 21 de janeiro de 2013).

3 USOS E PERSPECTIVAS DE USO DE (Q)SAR E DE OUTROS SISTEMAS ESPECIALISTAS NO AMBIENTE REGULATÓRIO.

Verifica-se que muito ainda precisa ser desenvolvido com relação a utilização de (Q)SAR do ponto de vista da toxicologia regulatória. Existem muitas publicações sobre (Q)SAR. Assim, uma busca simples, realizada em 05 de maio de 2012, com o descritor 'QSAR' em bases de dados como *PubMed*, *Web of Science* e *Scifinder*, identificou cerca de 18 mil publicações. Quando se adiciona o termo 'toxicity' esse número reduz mais de 90% (aproximadamente 1700) e se for adicionado o termo 'regulatory' esse número é reduzido para cerca de 60 publicações, o que demonstra, de certa forma, a necessidade de se desenvolver estudos sobre a utilização de (Q)SAR do ponto de vista regulatório.

Em outros países, considerando a necessidade de avaliação de compostos utilizados na indústria e que não foram devidamente testados, vários programas estão em andamento visando a utilização de testes alternativos, ou seja, que não utilizam métodos experimentais em animais (os chamados métodos padrão). Dentre esses testes alternativos destaca-se a utilização das abordagens (Q)SAR, que são utilizadas em três principais áreas de aplicação regulatória: priorização de compostos a serem avaliados e testados (eco)toxicologicamente; classificação e rotulagem de produtos e avaliação de risco (CRONIN; LIVINGSTONE, 2004).

No Brasil, a abordagem (Q)SAR não é aplicada na área regulatória, ou ainda, se aplicada, o é de forma ínfima. Este fato é observado, considerando que não existem programas de priorização para avaliação de compostos químicos não testados do ponto de vista toxicológico. E que os produtos que não se enquadram dentro, tanto da Lei n. 6.360/76, que estipula quais os produtos estão sujeitos à vigilância sanitária, bem como na Lei n. 7.802/89 de agrotóxicos e na regulamentação de produtos preservativos de madeira, não são submetidos à análise toxicológica e não receberão, portanto, qualquer tipo de classificação. Em outras palavras, nenhuma avaliação sobre a toxicidade do produto à saúde humana, ou ao meio ambiente, é realizada.

Na classificação e rotulagem de produtos não sujeitos às legislações supra mencionadas, existe a indicação de uso do Sistema Globalmente Harmonizado para

Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (*GHS*). No entanto, esse sistema ainda não é compulsório ou totalmente adotado pelo Brasil (ABIQUIM/DETEC, 2005).

Com relação a avaliação de risco, não se tem conhecimento se há a utilização de *(Q)SAR* no Brasil com esse propósito. Esse trabalho tem como objetivo desenvolver um procedimento para sua utilização regulatória em uma de suas etapas, a identificação de perigo de agrotóxicos, no entanto restringindo-se a avaliação de produto técnico por equivalência.

No ambiente regulatório em geral, para que métodos experimentais em animais e alternativos sejam utilizados é necessário que eles sejam baseados nas leis e protocolos nacionais, supranacionais e internacionais, como os protocolos *OECD*, ou seja, existe a necessidade de que os testes em animais e alternativos sejam desenvolvidos, padronizados e formalmente validados. Para isso entidades como a *OECD* (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) e *ECVAM* (*European Center for Validation of Alternative Methods*) levam entre 1,5 a 10 anos para cumprir tais requisitos. Essa demora é causada pela busca do consenso entre as partes envolvidas no processo e propicia a perda de interesse dos seus desenvolvedores (GARTHOFF, 2005).

Nesse sentido, em 2004, os estados membros da *OECD* e da *EC* adotaram os cinco princípios para validação de *(Q)SAR* para fins regulatórios (FJODOROVA; NOVICH, 2008) (i) ter um *endpoint* definido; (ii) ter um algoritmo não ambíguo; (iii) ter um domínio de aplicabilidade definido; (iv) ter uma medida apropriada da *goodness-of-fit*, da robustez e da preditividade; (v) ter, se possível, o mecanismo de ação interpretado. Dessa forma ficaram estabelecidos os critérios que devem ser seguidos para a construção de um modelo *(Q)SAR* e quais os requisitos necessários para a sua aceitação pelas agências reguladoras.

Atualmente, a indicação de uso de modelos de *(Q)SAR* pelas agências reguladoras é preventiva e conservativa, ou seja, um valor predito para um *endpoint* pode ser facilmente aceito para fins de classificação, se ele sugerir o pior cenário. De acordo com o guia de validação *OECD* (*Guidance Document On The Validation of (Quantitative)Structure-Activity Relationships [(Q)SAR] Models*) publicado em 2007, para aceitação da abordagem metodológica *(Q)SAR* ou, outro método computacional por uma agência regulatória, há a necessidade da avaliação da qualidade do modelo e da provável acurácia da predição. Isso possibilita que o regulador, e o regulado, atribuam algum nível de confiança à predição.

Ressalta-se, entretanto, que a atribuição de qualidade a qualquer objeto, ou processo, tende a ser subjetivo e, dessa forma, certos critérios devem ser atribuídos aos componentes do *(Q)SAR*: atividade biológica, propriedades físico-químicas e processo de construção do modelo (CRONIN; LIVINGSTONE, 2004).

Algumas publicações foram feitas ressaltando os principais erros cometidos pelos desenvolvedores de modelos *(Q)SAR* (DEARDEN; CRONIN; KAISER, 2010; DOWEYKO, 2008; SCIOR et al., 2009; ZVINAVASHE; MURK; RIETJENS, 2008). Esses tipos de erros, geralmente, estão relacionados ao não cumprimento dos cinco princípios de validação de modelos, publicados pela *OECD*.

Dearden, Cronin e Kaiser (2010) identificaram 21 tipos de erros em diversas publicações onde foram apresentados modelos de *(Q)SAR*. Eles abrangem todos os componentes do *(Q)SAR* como descritores moleculares, atividade e o algoritmo e podem ocorrer de forma isolada, ou conjuntamente, em um mesmo processo de desenvolvimento do modelo.

Os primeiros erros ressaltados por Dearden e colaboradores (2010) foram a falha em considerar a heterogenicidade dos dados e o uso de dados de *endpoint* inapropriados. Estes erros estão relacionados ao primeiro princípio *OECD*, que determina que o modelo *(Q)SAR* deve ter um *endpoint* definido.

Pela definição da *OECD*, *endpoint* é qualquer propriedade físico-química, efeito biológico ou parâmetro ambiental relacionado à estrutura química, que pode ser medido, ou modelado. Dessa forma, ter um *endpoint* definido é determinar como ele foi medido, ou seja, se os dados foram obtidos por meio de um mesmo protocolo; qual a variabilidade experimental e se essa variabilidade ou incerteza pôde ser considerada de forma racional; se os dados permitem a validação do modelo; e principalmente se os valores de *endpoint* são suficientes para refletir as diferenças entre as estruturas químicas (OECD, 2007).

É aconselhável que os dados do *endpoint* modelado sejam gerados por um mesmo protocolo. No entanto, na maioria das vezes, os dados disponíveis pertencem a base de dados onde os estudos foram conduzidos com protocolos diferentes. Isso pode ser aceitável, desde que as diferenças não produzam valores de *endpoint* diferentes e que as incertezas sejam controladas. Se mais de um valor de *endpoint* é observado para um mesmo composto, pode-se

considerar a média destes valores, desde que um fator de 2 a 5, dependendo do tipo de *endpoint* a ser avaliado, não seja ultrapassado (BENFENATI, 2007).

Os protocolos de estudos toxicológicos podem ser aplicados a um grande espectro de substâncias, ou seja, possui um domínio químico amplo. As limitações de aplicação desses protocolos a um determinado composto podem ser associadas às propriedades físico-químicas, à toxicidade ou, a fatores limitantes inerentes ao experimento (OECD, 2007).

Um *endpoint* observado em um protocolo pode ser gerado por diferentes mecanismos de toxicidade, desde que resulte em um mesmo efeito tóxico. Quando um modelo de *(Q)SAR* é desenvolvido, deve-se ter em mente o mecanismo de ação que gera o *endpoint* e o domínio químico para que se obtenha um modelo coerente, preditivo e sem falácias estatísticas (OECD, 2007).

A unidade de medida do *endpoint* utilizada para fins regulatórios, geralmente, é definida em unidades de concentração ou dose por peso (mg/kg de peso corpóreo). Para a construção do modelo é necessário que esta unidade seja transformada para unidade molar, pois o efeito de um composto químico é descrito por uma relação extratermodinâmica de energia livre (ΔG) e uma consequência do número de moléculas presentes (DEARDEN; CRONIN; KAISER, 2010).

Alguns sistemas especialistas fazem a conversão, após obtenção da predição, para a unidade geralmente utilizada para fins regulatórios. Porém, atenção deve ser dada a essa transformação para que se obtenha um dado cientificamente válido.

O segundo princípio *OECD*, refere-se a necessidade de obtenção de um algoritmo inequívoco. De acordo com este guia *OECD* (2007), o algoritmo de um modelo é entendido como o tipo de relação entre o descritor molecular e o *endpoint*. Pode ser um modelo matemático, ou, uma regra baseada no conhecimento desenvolvida por um especialista.

Para que um algoritmo seja inequívoco, seus parâmetros e/ou regras devem ter sido obtidos de forma correta. A obtenção equivocada engloba outros erros identificados por Dearden, Cronin e Kaiser (2010) na definição, compreensão, linearidade, reprodutibilidade e cálculo dos descritores moleculares, utilizados na construção do modelo *(Q)SAR*.

Os descritores moleculares são geralmente calculados por *softwares* específicos. Como mencionado anteriormente, milhares deles podem ser calculados em poucos segundos. No entanto, apesar do erro dos modelos estarem geralmente associados à atividade, devido a ampla variabilidade experimental, alguns erros podem ser encontrados também nos descritores, que são calculados a partir da estrutura química (DEARDEN; CRONIN; KAISER, 2010).

A determinação correta da estrutura química das séries é o primeiro passo para a construção de um modelo. Segundo Benfenati (2007), o parâmetro estrutural deve ser checado quanto ao nome do composto, número *CAS*, notação *SMILES*, presença de isômeros (tautômeros e estereoisômeros) e possíveis modificações da estrutura química nas diferentes fases de cálculo dos descritores.

Uma etapa simples, mas extremamente importante, antes de se iniciar a construção de um modelo, é “limpar” os registros dos compostos na base de dado que será utilizada. Esse procedimento inclui a remoção de dados que não podem ser apropriadamente tratados pelas técnicas normais, por exemplo, compostos inorgânicos ou, organometálicos, contra-íons, sais e misturas, estruturas não validadas, aromaticidade dos anéis, de forma tautomérica não definida e, ainda, de duplicatas (TROP SHA, 2010).

No caso dos estereoisômeros Tropsha (2010) ressalta que se os descritores forem calculados a partir da estrutura 2D, como ocorre para a maioria dos índices moleculares de conectividade, qualquer par de estereoisômeros será reconhecido como duplicata. Se a atividade estiver associada à uma quiralidade específica dos compostos, descritores que consideram a quiralidade devem ser utilizados e todos os isômeros devem ser mantidos na série de dados. Se, no entanto, a informação de quiralidade não estiver disponível, somente um composto, o que apresentar maior atividade(ou a média), deve ser utilizado e os descritores que consideram a quiralidade não devem ser utilizados.

Benfenati (2010) aconselha que, se possível, seja feita uma checagem dupla afim de verificar inconsistências e existência de duplicidade de compostos com diferentes *endpoints*. A dupla checagem pode evitar a replicação de compostos nas séries de dados. Essa replicação pode ocorrer considerando-se que um mesmo compostos pode ter nomes, *SMILES* e número *CAS* diferentes. Quando estruturas estão replicadas na série de treinamento, pode haver

influência no algoritmo e na preditividade. E, ainda, a existência de estruturas idênticas na série treinamento e na série teste pode causar a impressão de que o poder preditivo é muito maior do que realmente é.

A escolha dos descritores moleculares é uma parte importante na construção do modelo (KUBINYI, 1994). O uso de descritores colineares contribuem, efetivamente, para a mesma informação em duplicata e nenhuma informação é adicionada à interpretação mecanística. Ainda, pode causar instabilidade no coeficiente de regressão. Para evitar esse tipo de erro é necessário avaliar a probabilidade (*p-valor*) e observar o sinal dos valores dos coeficientes da equação (DEARDEN; CRONIN; KAISER, 2010).

É comum se observar a utilização de descritores moleculares incompreensíveis, ou seja, sem significado mecanístico, devido a grande disponibilidade de descritores. Nesses casos, o Princípio da Parcimônia (*Occam's Razor*) deve ser utilizado para manter o modelo mais simples e transparente possível. Na prática, de acordo com Dearden e colaboradores (2010), são encontrados na literatura alguns modelos *QSAR* cujos nomes e os números dos descritores usados não estão disponíveis ou ainda, com alguns, ou todos os descritores com significados confusos, sem relevância ou explicação claras, ou, conhecidas.

Todos os cuidados devem ser tomados para evitar os erros mencionados acima e, assim, espera-se que haja uma completa descrição do algoritmo, permitindo que o usuário entenda exatamente como o valor predito foi produzido possibilitando a reprodução dos cálculos, se desejar.

Dentro das etapas da aceitação regulatória Hartung et al. (2004) propuseram que a capacidade de transferência de um modelo é um parâmetro crucial para que ele seja considerado robusto. Isso implica que, para se utilizar a abordagem metodológica (*Q*)*SAR*, deve ser demonstrado que o modelo pode ser repetido com sucesso por outro usuário que não tenha participado da sua otimização. A capacidade de transferência de um modelo é importante para avaliar a praticabilidade do teste, ou seja, se ele pode ser utilizado por diferentes usuários com a obtenção de um resultado único. Também é fundamental prover uma estimativa da quantidade de compostos da série treinamento que será suficiente para que a variabilidade seja identificada e devidamente transferida ou reproduzida.

O terceiro princípio *OECD*, talvez um dos mais discutidos em publicações, é a determinação do domínio de aplicabilidade (DA) (ECETOC, 2003; ROBERTS; APTULA; PATLEWICZ, 2006; RUSYN et al., 2012; SCHULTZ et al., 2007; STANFORTH, 2007). Entende-se domínio de aplicabilidade (DA) como o espaço da resposta e/ou da estrutura química no qual o modelo faz previsões, com uma dada confiabilidade. Nessa definição, determinada estrutura química pode ser interpretada pela informação advinda de suas propriedades físico-químicas ou de seus fragmentos e a resposta correspondente pode ser qualquer efeito, seja ele biológico, ambiental ou, uma propriedade físico-química que está sendo predita (OECD, 2007).

A determinação do DA é de responsabilidade do desenvolvedor do modelo. Pode se basear na avaliação dos valores dos descritores, em *coverage* (método *leverage*) ou na similaridade entre a substância a ser avaliada e a série treinamento, no método de construção do modelo e na hipótese utilizada. No entanto, a maioria dos modelos publicados ou utilizados nos sistemas especialistas não demonstram o domínio de aplicabilidade e este fato prejudica a transparência do ponto de vista regulatório (NETZEVA et al., 2005).

O domínio de aplicabilidade pode ser descrito de várias formas (Figura 3). A maneira prática de se descrever um domínio de aplicabilidade pode ser a de determiná-lo por meio do intervalo dos valores dos descritores, ou, das respostas individuais (mínimo e máximo). No entanto, essa descrição não considera regiões de interpolação, onde a relação não é verificada (fora da *coverage*), ou onde ocorra um mecanismo de ação diferente do proposto pelo modelo (OECD, 2007).

O método de avaliação do DA por *coverage* utiliza a abordagem do *leverage* (ATKINSON, 1985 apud KAR; ROY, 2012) onde a predição é considerada não confiável para compostos que possuem valores de *leverage*(h) maiores que o *leverage* crítico(h^*), $h > h^*$ (KAR; ROY, 2012). O *leverage* dos compostos na série de treinamento variam de 0 a 1 e o *leverage* crítico(h^*) de um composto é a medida da distância do composto e o centróide da série de treinamento. O valor de h^* pode ser calculado pela fórmula $h^* = 3.p/n$ onde p é o número de descritores mais um (1) e n é o número de compostos da série de treinamento. Um alto valor de *leverage* indica que o composto está fora do espaço descrito pelo modelo. No entanto, deve-se ressaltar que um composto com baixo valor de *leverage* pode também estar

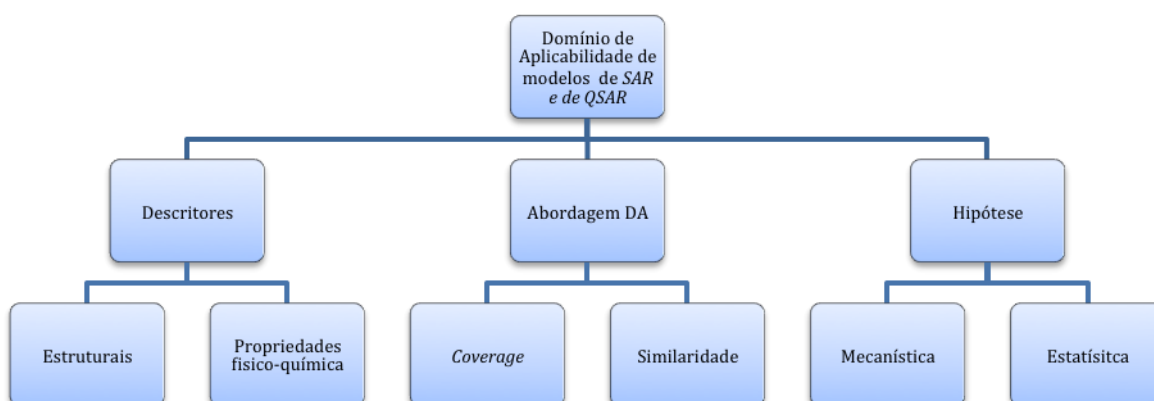
fora deste espaço por outro motivo, como por exemplo, presença de um toxiforo (fragmento estrutural ativo) estranho à série de treinamento (OECD, 2007).

Encontram-se descritos diferentes métodos baseados na análise de similaridade para a determinação do domínio de aplicabilidade. Todos esses métodos são baseados na premissa de que predições de um modelo *QSAR* são confiáveis se o composto para o qual a predição está sendo feita é similar aos compostos da série de treinamento. A similaridade pode ser medida de várias formas que foram revistas por Nikolova e Jaworska (2003).

Uma outra forma de determinar o domínio de aplicabilidade é a identificação de toxiforos que causam certo tipo de toxicidade (MAGGIORA, 2006).

Como pôde ser constatado, as formas de determinação do domínio de aplicabilidade não são exclusivas. A utilização de um domínio químico não impede a utilização de um domínio estatístico, ou a utilização de um domínio estatístico não impede a utilização de um domínio mecanístico (NETZEVA et al., 2005).

Figura 3 - Esquema ilustrativo dos aspectos do domínio de aplicabilidade (DA) de um modelo (*Q*)*SAR*



Fonte: Adaptado de Netzeva et al.(2005) com algumas modificações.

O domínio de aplicabilidade (DA) tende a ser mais amplo para a abordagem qualitativa do que para a quantitativa. Um modelo *QSAR* é geralmente restrito a um modo de ação específico e é, geralmente, construído com séries congêneres e menos amplas (SCHULTZ et al., 2007). No entanto, algumas ferramentas estatísticas podem ser utilizadas para a associação de modelos que pode ampliar o domínio de aplicabilidade mantendo uma boa preditividade (GINI; GARG; STEFANELLI, 2009).

Vale ressaltar que, mesmo que um *DA* seja bem definido, auxiliando o usuário a avaliar a confiabilidade da predição feita pelo modelo, não se deve automaticamente assumir que toda a predição dentro do *DA* será necessariamente confiável. Isso ocorre, porque um composto pode estar dentro do *DA* e possuir, no entanto, um mecanismo de ação diferente, não sendo detectado pelo modelo. Nesse caso, ele pode estar dentro do chamado “abismo da atividade” (*activity cliff*), que é o espaço descritor onde a hipótese básica de que compostos similares possuem atividades similares, não está sendo totalmente satisfeita (TROPISHA, 2010).

Abismo da atividade pode ser definido como a razão entre os valores das diferenças das atividades de dois compostos e as suas distâncias dentro de um dado espaço químico (MAGGIORA, 2006). Na prática, é a observação de que pequenas alterações na estrutura química podem causar grandes alterações na atividade, ou seja, existe a perda de preditividade do modelo, mesmo dentro de um determinado domínio de aplicabilidade. A presença do abismo da atividade pode ser considerado um dos motivos da observação de *outliers* em um modelo.

Dearden, et al. (2011) ressaltaram que no desenvolvimento de modelos de (*Q*)*SAR* os dados são obtidos frequentemente da literatura. Em muitos casos, os dados são selecionados de várias publicações ou de bases de dados. Na maioria das vezes, a razão dessa seleção não é explícita, como por exemplo, manter o número de compostos ou estudar uma determinada classe de compostos. Entretanto, essa escolha deve ser justificada para que o *DA* possa ser bem fundamentado.

Também deve ser bem fundamentada a razão da exclusão de *outliers*. *Outliers* podem ser observados por várias razões. Entre elas destacam-se o cálculo inapropriado dos valores dos parâmetros utilizados na construção do modelo, utilização de um algoritmo inapropriado

ou, mesmo, seguir um mecanismo ou modo de ação diferente do modelado (KIM, 2007). No entanto, um *outlier* deve ser detectado e avaliado para se entender a razão da sua presença e, se esta pode ser explicada. Quando corretamente excluídos, os *outliers* permitem desenvolver um modelo mais forte e significativo (DEARDEN; CRONIN; KAISER, 2010).

De acordo com Gedeck (2005), o coeficiente de regressão (r^2) de um modelo pode ser melhorado se os intervalos entre os valores numéricos dos *endpoints* forem maiores, pois diferenças muito pequenas entre os valores de *endpoints* podem não ser detectadas (sensibilidade) pelo modelo de *(Q)SAR*. Adicionalmente, compostos com baixa atividade, ou com valores de *endpoints* que representam baixa ou nenhuma toxicidade, são considerados dados censurados, pois não acrescentam nenhuma informação ao modelo de *(Q)SAR*.

Topliss e Costello (1972) demonstraram que para minimizar o risco de se obter correlação ao acaso, a proporção entre a série treinamento e os descritores deveria ser de no mínimo 5:1. E, mais tarde Topliss e Edward (1979) alertou para o risco de se obter uma correlação ao acaso, não meramente pelo uso de um grande número de descritores, mas também pelo uso de uma grande conjunto de descritores, do qual será retirado o descritor final selecionado para ser usado para propor o modelo. Eles demonstraram que se um *pool* de 70 descritores forem usados, um mínimo de 98 compostos na série de treinamento seriam necessários para produzir um $r^2 \geq 0,8$ com uma correlação ao acaso menor que 0,01. Dessa forma, deve-se, como salvaguarda, calcular o *y-scrambling* (ou *y-randomização*) no conjunto completo de descritores, não somente nos descritores selecionados. Um determinado composto, com padrão de resíduos da validação cruzada maiores que 3(três) são considerados *outliers* desta resposta (SCHULTZ et al., 2007).

Dearden et al. (2011) ressaltou dentro do quarto princípio OECD as seguintes não-conformidades (i) a falta ou o uso inadequado de métodos estatísticos; (ii) cálculos incorretos; (iii) falta de auto-escalamento dos descritores; (iv) erros de interpretação das estatísticas; (v) seleção inadequada das séries. Estas não-conformidades podem gerar previsões ou modelos inválidos.

Tropsha (2010) propôs um fluxo de trabalho para o desenvolvimento e validação de um modelo de *QSAR* preditivo (Figura 3). E, também ressaltou que um modelo preditivo de *QSAR* pode ser utilizado como uma forma de identificação de compostos que poderão ter

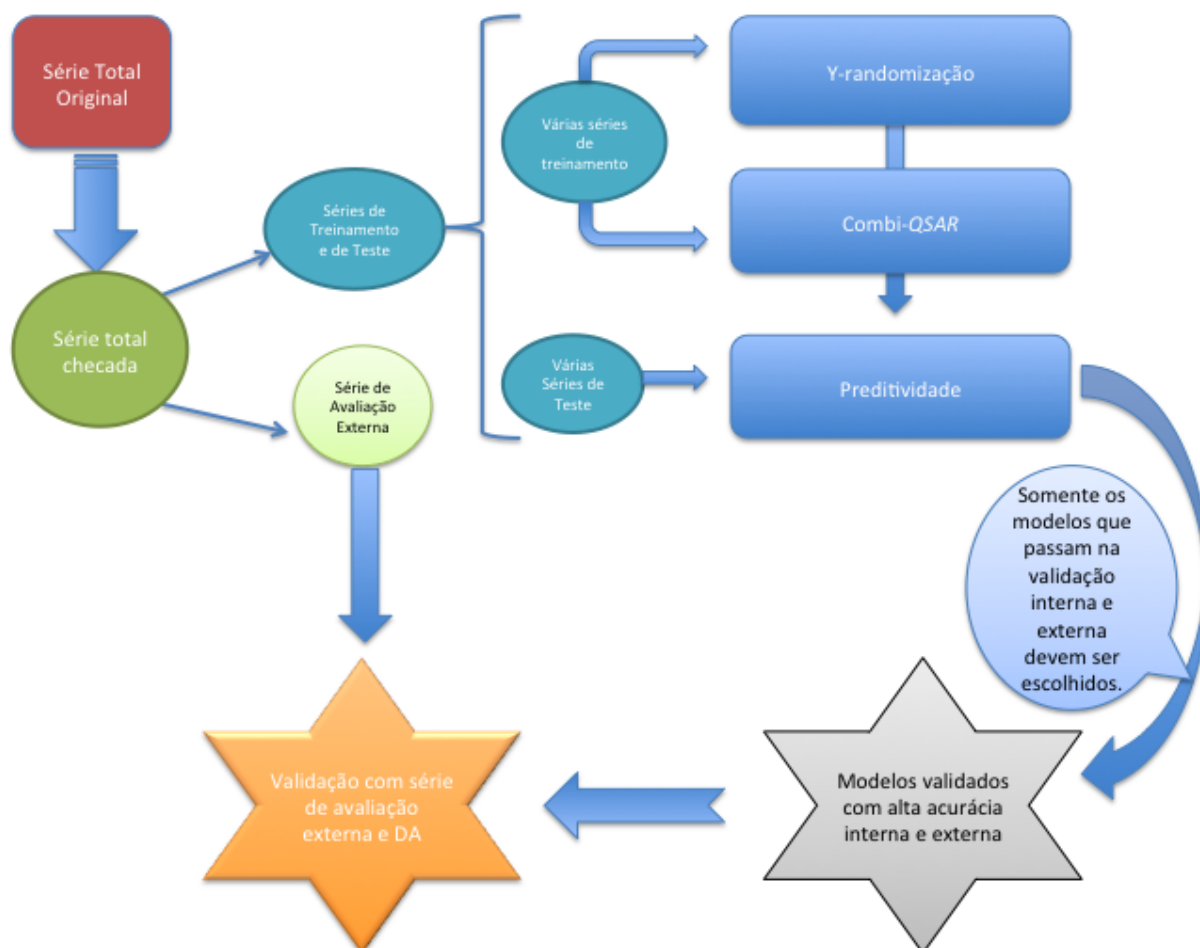
prioridade para serem testados experimentalmente, por meio de *virtual screening*. Nessa proposta, ele incorporou, resumidamente, os cinco princípios da OECD com alguns procedimentos, relativos à:

- (i) acurácia e “limpeza” do registro dos dados relativos à estrutura e à atividade (*endpoint*). O procedimento pode ser realizado conforme mencionado anteriormente (TROPSHA, 2010; BENFENATI, 2010);
- (ii) divisão das séries, também levando em consideração a necessidade de uma série de avaliação externa, como já proposto por Martin et al. (2012);
- (iii) validação interna com a utilização de y-randomização e do emprego de múltiplas técnicas de *QSAR* baseadas na exploração combinatória de todos os possíveis pares de conjunto de descritores e várias técnicas de análise supervisionadas (*Combi-QSAR*);
- (iv) seleção apenas dos modelos que possuem critérios de validação interna e validação externa aceitáveis;
- (v) validação do modelo com a série de avaliação externa, usando o domínio de aplicabilidade.

O quinto e último princípio da *OECD* se refere a necessidade de interpretação mecanística dos modelos propostos. No entanto, nem sempre essa interpretação é possível do ponto de vista científico. Um modelo pode possuir múltiplas interpretações e a falta de interpretação não faz com que o modelo seja inútil para o contexto regulatório. No entanto, deve se atentar para as falácias lógicas (OECD, 2007).

A maioria dos sistemas especialistas disponíveis não atendem plenamente os princípios da *OECD*. Os motivos podem ser confidencialidade da informação das bases comerciais, falta de consideração do DA do modelo, utilização de algoritmos não transparentes e a ausência de interpretação mecanística na predição do *endpoint*.

Figura 4 - Esquema proposto para os procedimentos de validação interna e validação externa para obtenção de modelos *QSAR* preditivos, com a inclusão de outra validação externa, com compostos pertencentes ao domínio de aplicabilidade (DA) que não foram utilizados na validação inicial.



Fonte: Adaptado de Tropsha (2010)

Mesmo não atendendo aos princípios em sua plenitude, esses sistemas tem sido utilizados por agências reguladoras, sempre de forma conservativa, como forma de auxiliar na tomada de decisão para alguns *endpoints* específicos, conforme pode ser visto no quadro abaixo (Quadro 4).

Quadro 4 - Lista dos *Endpoints* avaliados, métodos e ferramentas utilizadas por algumas agências reguladoras, com as respectivas referências.

Lista dos Endpoints Avaliados	Métodos e ferramentas utilizadas	Agência Reguladora	Referências
Várias propriedades físico-químicas, parâmetros de destino ambiental, <i>endpoints</i> ecotoxicológicos e de saúde humana.	Métodos disponíveis em normas dos EUA e EC.	U.S. EPA e EC	U.S. EPA(1994)
Sensibilização Dérmica	<i>DEREK</i>	German Federal Institute For Health Protection Of Consumers And Veterinary Medicine	Zinke <i>et al.</i> (2002)
Mutagenicidade, carcinogenicidade, sensibilização dérmica , toxicidade aguda, toxicidade a organismos aquáticos	<i>M-CASE e TOPKAT</i>	Danish Environmental Protection Agency	Tyle <i>et al.</i> (2001)
Toxicidade aguda a <i>Fathead minnow</i>	<i>ECOSAR, TOPKAT</i> , rede neural probabilística, rede neural computacional, <i>ASTER, OASIS</i>	Environment Canadá	Moore <i>et al.</i> (2003)

Fonte: Adaptado de Cronin e Livingstone (2004). Referências citadas pelos autores.

Algumas publicações (BENFENATI; BENIGNI, 2009; WORTH *et al.*, 2011 c) sugerem que a utilização de mais de um sistema especialista para um único *endpoint* pode melhorar o poder de preditividade.

Essa melhoria pode ser devido às diferenças nos sistemas, por exemplo, algoritmo baseado no conhecimento ou em alertas estruturais; alertas estruturais *versus* inteligência artificial (ex. *data mining*¹) ; *SAR* versus *QSAR*; domínio de aplicabilidade e o quanto o modo de ação é considerado no desenvolvimento do modelo (BENFENATI; BENIGNI, 2009).

¹ A OECD (2007) define *data mining* como um termo coletivo que se refere a todos os procedimentos, de informática e de estatística, que são aplicados a um conjunto de dados heterogêneo como a finalidade de desenvolver uma matriz de dados responsiva a métodos estatísticos .

Dois métodos podem ser adotados quando diversos modelos *(Q)SAR* forem usados para a predição de um mesmo *endpoint*: abordagem de consenso entre os *(Q)SARs* e do uso em baterias de *(Q)SAR* (OECD, 2007).

No primeiro método, se um composto a ser predito cai dentro da intersecção do DA de modelos diferentes, a confiança da predição geral pode ser obtida pela média (ou outra transformação) da confiança das predições individuais de cada modelo (OECD, 2007). Uma desvantagem desse método pode ser a redução do domínio de aplicabilidade do modelo obtido pela abordagem de consenso.

O segundo método, abordagem do uso em baterias de *(Q)SAR*, refere-se a adição de predições de vários modelos que usam paradigmas lógicos e algoritmos diferentes (VOTANO et al., 2004 apud OECD, 2007). Esse método é usado para expandir o conhecimento e dar visões adicionais sobre as propriedades moleculares significativamente correlacionadas com o mesmo *endpoint*. Por exemplo, a escolha de modelos de *(Q)SAR*, para utilização da abordagem em bateria, pode ser feita considerando aqueles que utilizam fragmentos estruturais ou descritores moleculares, que estão relacionados ao mesmo *endpoint*. Cada *(Q)SAR* é escolhido baseado na validação na qual o *(Q)SAR* exibe alta especificidade para o *endpoint*. Esse método, teoricamente, irá aumentar o DA, porque cada modelo pode ter DA não coincidentes, ou seja, com séries de compostos heterogêneos e não-congêneres (OECD, 2007).

Para comparar o desempenho dos modelos de classificação, pode ser utilizada a curva *ROC* (*Receiver Operating Characteristic*), colocando em um gráfico os valores da razão dos positivos verdadeiros contra os da razão dos falso-positivos. Um modelo cuja intersecção dos valores está disposta no topo esquerdo do gráfico é considerado ideal (altamente preditivo), e um modelo cuja intersecção está ao longo da diagonal do gráfico produz predições ao acaso (OECD, 2007).

A confiança e o tratamento das predições discordantes por um modelo de *(Q)SAR* pode ser avaliado pelo usuário e, necessita alcançar a maior sensibilidade ou especificidade para as predições. Por exemplo, a adição do resultado de dois *(Q)SAR* tendo alta especificidade e baixa ou moderada sensibilidade resulta em alta especificidade e pode

resultar no aumento da sensibilidade. Um exemplo de comparação de modelos com aumento de preditividade pode ser visto em Worth et al. (2011c).

Sistemas baseados no conhecimento (*knowledge based*) são mais úteis na identificação de resultados preditivos para toxicidade e para o entendimento do mecanismo, ou, modo de ação. Nesses sistemas, compostos que possuem maior toxicidade, podem ser identificados e encaminhados para uma avaliação mais criteriosa quanto ao nível aceitável de exposição àquele composto, quando deve ser utilizado um modelo quantitativo com menos incerteza (BENFENATI; BENIGNI, 2009).

Após todas as considerações feitas sobre a utilização regulatória do (*Q*)SAR resta clara a necessidade do aumento do seu uso no ambiente regulatório. Muito ainda deve ser desenvolvido para que a ele possa substituir os testes padrão. No entanto, de forma suplementar, a abordagem (*Q*)SAR tem sido muito utilizada para o suporte de decisões de registro de substâncias novas e na manutenção das já disponíveis no mercado. Assim como para a avaliação de produtos de metabolização, impurezas e substâncias que geralmente não são testadas completamente do ponto de vista toxicológico.

O principal desafio do avaliador (agências reguladoras) é a implementação de abordagens de avaliação de substâncias químicas que alcancem um máximo de proteção à saúde humana e ao meio-ambiente, requerendo um mínimo de testes padrão, ou seja, utilizando testes alternativos, que demonstrem gerar informações equivalentes e adequadas à avaliação (AHLERS; STOCK; WERSCHKUN, 2008).

A integração de testes padrão (*in vivo*) com os testes alternativos (*in vitro* ou *in silico*) e a atribuição de peso às evidências tem sido uma abordagem desenvolvida pela EC por meio do *Integrated Test Strategies (ITS)* para atender a legislação relativa à avaliação de substâncias químicas novas e existentes, *REACH – Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals* (ELLISON et al., 2010; WORTH et al., 2011c).

A utilização de testes alternativos e integração dos mesmos já vinha sendo desenvolvido pelos EUA desde a década de 1980, para agilizar as tomadas de decisão referentes a novos compostos. Em 1998, eles lançaram uma série de protocolos utilizando essa abordagem de integração de testes, com o propósito de implementar o *US HPV Challenge Program*, que é um programa que atribui prioridade para avaliação de compostos

ainda não testados, considerando os respectivos volumes de produção (LEEUWEN et al., 2009).

Segundo Weed (2005) várias definições para o termo "peso da evidência" (*weight of evidence*) podem ser encontradas na literatura. Essas são dependentes do propósito de aplicação. No contexto do *REACH* e do *US HPV*, o peso da evidência pode ser definido como a abordagem utilizada quando os dados de uma única fonte são considerados insuficientes para uma conclusão, mas informações concordantes de várias fontes podem ser suficientes para a tomada de decisão em certas condições (ELLISON et al., 2010).

As informações que suportam o peso da evidência podem ser fundamentadas em diferentes fontes e possuírem vários graus de incerteza. A relevância e a confiabilidade de uma predição precisam ser avaliadas em relação ao propósito regulatório em particular, ainda, levando em consideração a existência de outras informações no contexto de avaliação do peso das evidências (WORTH et al., 2011c).

Dados oriundos de testes padrão tem prioridade na tomada de decisão, ou seja, os dados gerados pelos testes padrão possuem um menor incerteza associada e devem ser considerados com maior peso no conjunto de evidências. Dados de origem não padrão (alternativos) são particularmente úteis, pois eles ajudam a evitar a utilização de dados que não correspondem a descrição verdadeira sobre um composto em relação as suas propriedades físico-químicas e ou toxicológicas. Também, são úteis ao considerar quais resultados são mais confiáveis no conjunto de dados conflitantes, além de determinar quais testes subsequentes são necessários e essenciais para uma avaliação segura (AHLERS; STOCK; WERSCHKUN, 2008).

Isto posto, um procedimento de avaliação de produto técnico por equivalência pode ser proposto considerando as informações levantadas quanto a aplicabilidade do métodos de (*Q*)*SAR* no ambiente regulatório, sua validação, associação de modelos ((*Q*)*SAR* de consenso e de bateria) e o uso do peso da evidência.

Para isso, uma análise de todo o processo de avaliação de um produto técnico equivalente foi realizada a seguir, levantando os pontos críticos à avaliação em relação às necessidades regulatórias. O cumprimento das necessidades regulatórias é condição essencial para que a aplicação de métodos alternativos, nesse caso específico, dos modelos de (*Q*)*SAR* e

dos sistemas especialistas, gerem uma informação adequada e segura para uma tomada de decisão.

4 PONTOS CRÍTICOS NA AVALIAÇÃO DE AGROTÓXICOS POR EQUIVALÊNCIA E SUA INTERFACE COM (Q)SAR

No Brasil o registro de agrotóxicos por equivalência é regulamentado pelo Decreto n. 4.074/02 e pelo Decreto n. 5.981/06 que inseriu os critérios da equivalência entre produtos técnicos e tornou o processo de avaliação desse tipo de registro em fase seguindo as tendências internacionais (BRASIL, 2002). Pela Lei n. 7.802/89, que é regulamentada por esses Decretos, um produto técnico é o produto obtido diretamente de matérias-primas por processo químico, físico ou biológico, destinado à obtenção de produtos formulados ou de pré-misturas e cuja composição contenha teor definido de ingrediente ativo e impurezas, podendo conter estabilizantes e produtos relacionados, tais como isômeros.

De acordo com a legislação, a avaliação é feita conjuntamente pelos agentes dos três órgãos federais responsáveis pelas pastas da agricultura, meio-ambiente e saúde: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais e Renováveis (IBAMA) e Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

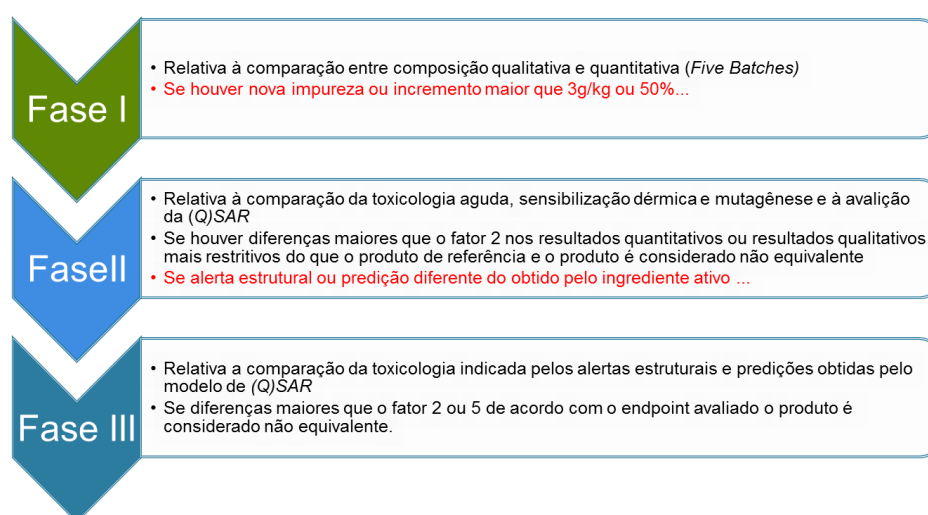
A avaliação conjunta significa que a decisão sobre a equivalência entre os produtos é consensuada entre os órgãos, ou seja, existe uma espécie de unificação das competências ou responsabilidade solidária no parecer final emitido, diferente dos outros tipos de registro de agrotóxicos onde as competências são bem determinadas e existe um parecer para cada órgão.

A Fase I do registro por equivalência é baseada na avaliação comparativa entre as fontes de referência e a candidata a equivalente. São comparados os dados da composição qualitativa e quantitativa de acordo com critérios estabelecidos na legislação.

Segundo o Decreto, para um produto técnico ser considerado equivalente não podem existir, na sua composição, novas impurezas ou incrementos maiores que 3g/kg ou 50% no limite máximo declarado. Caso sejam verificadas alguma ou ambas as situações o produto não pode ser considerado equivalente na Fase I e a avaliação deve ser encaminhada para Fase II ou III.

Pela legislação, a Fase II ou III é relativa à comparação dos dados toxicológicos e ecotoxicológicos dos produtos candidato a equivalente e referência. A análise visa verificar se o produto candidato a equivalente não apresenta maior perigo que o produto de referência (FAO, 2010). Quando o resultado obtido pelo estudo é um dado numérico se aplica um fator de 2 para os estudos toxicológicos e, um fator de 5 para os estudos ecotoxicológicos (BRASIL, 2002).

Figura 5 - Esquema representativo do processo de avaliação de produtos técnicos equivalentes, suas respectivas fases I, II e III, e critérios que conduzem à fase seguinte de avaliação ou à conclusão sobre a não equivalência.



Fonte: Proposto nesse trabalho com base em BRASIL (2002).

4.1 Análise da Fase I

Verifica-se e infere-se da legislação que o processo de avaliação de equivalência na Fase I é objetivo, ou seja, os dados obtidos nos estudos analíticos de composição qualitativa e quantitativa são comparados quantitativamente quanto aos parâmetros lógicos de igualdade, de superioridade e de inferioridade. Dessa forma, é necessário que se tenha controle dos valores das incertezas analíticas, visando à redução dos possíveis vieses que podem estar intrínsecos aos critérios de comparação, ou seja, a diferença entre o valor observado e o valor real precisa estar dentro ou menor do que o erro analítico experimental.

A comparação é feita a partir dos limites máximos do produto técnico que são especificados, ou declarados pelo fabricante para cada impureza relevante, ou seja, pela

impureza que possua limites absolutos possíveis e/ou prováveis maiores que de 0,1% (m/m). A comprovação analítica dessa possibilidade e/ou probabilidade de ocorrência da impureza e do teor de ingrediente ativo é feita em no mínimo cinco lotes representativos do processo produtivo, ou, como definido no Decreto n. 4.074/02, do estudo laboratorial de cinco bateladas (BRASIL, 2002). Não existe na legislação a definição de lotes representativos. A decisão da representatividade do lote é de responsabilidade do fabricante.

O conhecimento do processo de síntese é condição *sine qua nom* para a pesquisa analítica das impurezas, considerando que a maioria das impurezas é oriunda dos materiais de partida, produtos de degradação e intermediários reacionais (ICH, 2006). O Decreto n. 4.074/02 destaca os itens do processo de síntese que devem ser devidamente descritos pelo fabricante, única pessoa habilitada para tal, de forma que todas as etapas e controles necessários a otimização do processo sejam devidamente discutidas.

Dentro dos dados destacados, observa-se que a discussão teórica sobre a formação de impurezas é um item relevante para o planejamento do estudo laboratorial de cinco bateladas. O planejamento do estudo deve ser feito considerando todas as impurezas discutidas pelo fabricante.

Devido à complexidade das reações químicas e dos inúmeros subprodutos, isômeros, produtos de degradação que podem ocorrer durante a síntese, pode ocorrer a presença de uma impureza não discutida. Nesse caso, o processo de síntese e conseqüentemente a referida descrição deve ser reavaliada pelo fabricante para que os ajustes produtivos ou regulatórios sejam realizados.

Por se tratar de um estudo analítico para fins regulatórios, verifica-se a necessidade de rastreabilidade dos dados por meio do registro de instalações, equipamentos e recursos humanos adequados, que são reflexos do reconhecimento de conformidade em Boas Práticas Laboratoriais (BPL) (INMETRO, 2002).

O estudo laboratorial de cinco bateladas pode ser didaticamente dividido em partes: (i) identificação e determinação do perfil de impurezas, (ii) desenvolvimento da metodologia, (iii) validação analítica e (iv) quantificação de cinco lotes representativos. O objetivo principal do estudo laboratorial de cinco bateladas é verificar o balanço de massa, por meio do fechamento analítico, que é a somatória dos teores obtidos por meio das metodologias

analíticas dos componentes (ingrediente ativo e impurezas) do produto técnico, e assim determinar inequivocamente a composição qualitativa e quantitativa do produto, ou seja, o perfil de impureza. Para essa verificação é necessário que se desenvolva uma metodologia de varredura qualitativa e quantitativa do produto. Essa metodologia deve ser adequada às características químicas de cada produto, ou seja, a metodologia deve ser suficiente para se responder a pergunta analítica (ICH, 2006; FAO, 2010; APVMA, 2007; CTA, 2005; EC, 2000).

Na maioria das vezes, utilizam-se técnicas de separação como cromatografia líquida e/ou gasosa acoplada a detectores de Ultravioleta usando sistema de Diodos (UV-DAD) e detector de Espectroscopia de Massas (EM). Deve ser demonstrado que o método escolhido consegue realizar a separação das impurezas. Para isso as características químicas das impurezas devem ser levadas em consideração na escolha das fases móvel e estacionária, temperatura, fluxo e modo isocrático ou gradiente (ICH, 2006).

No caso de utilização de detectores de UV-DAD, deve ser comprovado que o comprimento de onda utilizado consegue representar o perfil de impurezas mais adequado e é suficiente para sugerir quais impurezas devem ser pesquisadas, considerando que todas que estiverem, por normalização de área, próximas a 0,1% devem ser devidamente identificadas, quantificadas e declaradas pelo registrante. Entende-se como comprimento de onda adequado aquele que consegue estimar as quantidades de impurezas de forma a não subestimá-las (ICH, 2006).

Quando espectrometria de massas, for utilizada deve ser demonstrada a pureza do pico com relação aos seus pesos moleculares. No caso onde os pesos moleculares não são suficientes para diferenciar as impurezas, outra metodologia deve ser proposta para a identificação inequívoca (ICH, 2006; EC, 2000).

Após verificação do perfil de impurezas orgânicas relacionadas ao ingrediente ativo, ou seja, o composto que possui a atividade biológica de interesse, devem ser pesquisadas as impurezas inorgânicas e água. Essa pesquisa pode ser feita com base em metodologias indiretas por grupamento químico e/ou gravimétricas como cloretos, sulfatos, materiais voláteis, insolúveis em acetona, insolúveis em hidróxido de sódio, cinzas totais ou sulfatadas etc. Essas metodologias são amplamente conhecidas e publicadas pelo *Collaborative*

International Pesticides Analytical Council- CIPAC ou *pela Association of Analytical Communities – AOAC* (FAO, 2010).

Ainda, com base no processo de síntese, os principais solventes orgânicos podem ser pesquisados, principalmente quando os mesmos são utilizados nas etapas finais como purificação e cristalização (FAO, 2010; APVMA, 2007; EC, 2000).

Com o conhecimento de quais impurezas devem ser quantificadas, deve-se partir para a procura das substâncias de referência para a identificação e quantificação inequívoca das impurezas. Essas substâncias de referência podem ser obtidas comercialmente, por meio do isolamento laboratorial ou por meio da síntese pelo fabricante. Ainda, devem possuir grau de pureza suficiente para a finalidade que se propõe e serem acompanhadas dos seus respectivos certificados de análise com a indicação dos métodos de quantificação e identificação utilizados para determinação, respectivamente, da identidade, do teor e da incerteza da medição (INMETRO, 2010).

No caso de serem sintetizadas ou isoladas devem ser providenciadas sua quantificação e identificação inequívoca por meio de métodos primários, a saber, titulometria, gravimetria, calorimetria exploratória diferencial-*DSC* e ressonância magnética nuclear-*RMN*, ou seja, que não dependem de padrões primários, ou, oficiais (EC, 2011; INMETRO, 2010). Ressalta-se que devem ser produzidas em quantidades suficientes para a identificação e quantificação em mais de uma metodologia analítica (EC, 2011).

Vencida essa etapa, deve se iniciar o desenvolvimento das metodologias analíticas e sua validação.

Nessa primeira etapa de avaliação da equivalência é indispensável que se verifique a incerteza analítica das metodologias utilizadas para a determinação da composição qualitativa e quantitativa do produto. Sem o controle das incertezas, por meio da validação analítica, a avaliação se torna incapaz de atingir os objetivos quantitativos necessários para comprovação do resultado numérico (valor das medições) (ANVISA, 2004).

Em um estudo de cinco bateladas, é essencial que além da quantificação e identificação do ingrediente ativo por meio de técnicas como EM, RMN-¹H, RMN-¹³C e

Infravermelho (IV), as impurezas também recebam tratamento analítico semelhante, pois são elas que norteiam a avaliação, direcionando o processo decisório sobre a equivalência.

Verifica-se que em outros países (FAO, 2010; EC, 2011), o teor certificado/declarado do ingrediente ativo é um parâmetro determinante da avaliação, diferente do Brasil, onde a consideração em relação à equivalência entre as fontes está diretamente vinculada ao perfil de impurezas e sua influência na massa total do produto, considerando que devem ser quantificadas todas as impurezas maiores que 0,1% constantes no produto e que mais de 98% do produto técnico deve ser identificado. Isto é, apenas 2% das impurezas do produto podem ser desconhecidas, desde que não exista, entre elas, qualquer impureza maior do que 0,1% (BRASIL, 2002).

Após o árduo trabalho de determinação do balanço de massa do produto parte-se para elaboração da declaração.

Para a elaboração da declaração é necessário considerar as variações no processo de síntese do produto que podem acarretar flutuações dos teores de impurezas (ICH, 2006). Essas variações são características dos processos de síntese e podem ser observadas tanto nos teores de ingrediente ativo como nas impurezas do produto final. Essas variações nos teores podem ser explicadas pela distribuição gaussiana. Dessa forma considera-se aceitável uma variação, em relação à média dos resultados encontrados no estudo de cinco bateladas, de até três desvios padrão, o que corresponde a 99,7% de probabilidade de ocorrência dos teores. Entretanto, alguns processos são mais flutuantes e, quando acompanhado de justificativa técnica, pode ser aceito um desvio padrão de até cinco desvios padrão (aproximadamente 99,9%) (FAO, 2010).

Considerando ainda essa flutuação, caso o processo de síntese já esteja bem estabelecido, dados de controle de qualidade podem ser aceitos para justificar teores maiores encontrados (CTA, 2005). Ressalta-se, no entanto, que esses dados devem ser avaliados cuidadosamente, pois, geralmente, os laboratórios de controles de qualidade dos fabricantes não dispõem de certificação de qualidade por organismos acreditadores, o que pode comprometer a qualidade analítica. Além disso, esses dados não podem ser utilizados, de acordo com a legislação brasileira, para a inclusão de novas impurezas na declaração, devido

a sua fragilidade com relação à quantificação, à rastreabilidade e à conformidade com os procedimentos das BPL (INMETRO, 2002).

Dessa forma, infere-se que, do ponto de vista regulatório brasileiro, se uma nova impureza for identificada durante os procedimentos de controle de qualidade, novo estudo de cinco bateladas deve ser conduzido e novas informações devem ser complementarmente apresentadas, como a discussão de formação da impureza (BRASIL, 2002). No entanto, do ponto de vista técnico produtivo, da quantificação e da rastreabilidade, se existirem subsídios e justificativas suficientes para esclarecer o motivo pelo qual a nova impureza não foi detectada no estudo de cinco bateladas os mesmos não devem ser sumariamente descartados da avaliação e a autoridade regulatória pode considerar as justificativas.

Nesse ponto, como um hiato regulatório, pode ser observada a ausência de um tempo para aceitação de dados gerados pelos estudos de cinco bateladas. Em outros países existe um tempo de corte para dados gerados entre dois a cinco anos para a elaboração da declaração, ou seja, estudos conduzidos a mais de cinco anos não são aceitos para fins regulatórios (APVMA, 2007). Esse hiato pode ser justificada pelo tempo levado para a obtenção de um registro no Brasil que pode levar até cinco anos (ANVISA,2012).

Ainda nesse mesmo ponto, com relação à responsabilidade administrativa, civil e penal a declaração deve ser elaborada pelo requerente de registro estabelecido no Brasil (BRASIL, 2002). Essa exigência faz com que, muitas vezes, os dados dos processos não sejam concisos tendo em vista que muitas vezes o requerente não tem conhecimento das especificações do fabricante e elabora uma declaração que não corresponde ao produto. Essa incongruência muitas vezes leva ao indeferimento dos pleitos por descumprimento do Decreto em relação aos itens referentes à declaração (CTA, 2005).

Superada a fase da avaliação de comparação da composição qualitativa e quantitativa (Quadro 5) e o produto demonstra não-equivalência, passa-se a Fase II. Nesta fase, são solicitados dados de respaldo e argumentos fundamentados que comprovem os motivos pelos quais as impurezas (novas ou incrementadas) em particular podem ser consideradas como não relevantes e também os estudos de toxicidade aguda e de mutagênese (BRASIL, 2002).

Quadro 5 – Exemplo ilustrativo das comparações realizadas entre os limites declarados dos componentes dos produtos de referência e do candidato à equivalente. Resultado parcial da comparação considerando cada componente e resultado final considerando todos os componentes, a adequabilidade da declaração. E prováveis tomadas de decisão.

Descrição dos Componentes dos produtos	Declaração dos limites		Resultados parciais da comparação por componente	Tomada de decisão
	Produto de referência (g/kg)	Produto candidato à equivalência (g/kg)		
Ingrediente ativo	Mín. 960	Mín.970	Teor de ingrediente ativo não é comparado(1)	Equivalente
Impureza 1	Máx. 5	Máx. 10	Incremento da impureza maior do que 3g/kg ou 50%. O teor máximo aceitável da impureza para determinação da equivalência seria de 8g/kg	Não Equivalente
Impureza 2	Máx. 10	Máx.5	O produto candidato a equivalente tem teor menor da impureza	Equivalente
Impureza 3	Máx. 1	-	O produto candidato a equivalente não tem a impureza.	Equivalente
Impureza 4	-	Máx.2	Nova impureza com teor menor do que 10g/kg.	Não equivalente
Impureza 5	Máx. 20	Máx. 10	O produto candidato a equivalente tem teor menor da impureza	Equivalente
Resultado final Fase I	Somatória dos valores declarados é de 996 g/kg, ou seja, menos de 2% de impurezas desconhecidas.	Somatória dos valores declarados é de 997 g/kg, ou seja, menos de 2% de impurezas desconhecidas.	O produto candidato a equivalente tem uma impureza nova e uma incrementada.	Produto deve ser encaminhado para Fase II. Devem ser solicitados os estudos de mutagenicidade gênica e análise de (Q)SAR para as Impurezas 1 e 4.

Fonte: Adaptado BRASIL(2006)

Para a comprovação da não relevância da impureza nova, ou incrementada, são solicitadas as correspondentes análises das relações qualitativas/quantitativas de estruturalidade (Q)SAR (EC, 2011).

As análises de (Q)SAR solicitadas possuem foco apenas nos estudos toxicológicos, ou seja, voltadas para a avaliação de informações relacionados à saúde humana e não ao meio-ambiente (aves, peixes, algas, organismos aquáticos etc).

4.2 Análise da Fase II

Como mencionado anteriormente, a Fase II é composta pela avaliação dos estudos toxicológicos agudos e de mutagênese e dos dados gerados pela análise de *(Q)SAR*.

A aplicação da análise de *(Q)SAR* está recomendada pela Comunidade Européia (EC)(2011), com restrições, considerando que a maioria das bases de dados são adequadas para predição da toxicidade, mas não a ausência dela. Ainda, recomenda-se o fornecimento de informações relativas ao domínio da aplicabilidade, aos métodos estatísticos, quando utilizados e dos dados de validação do modelo (EC, 2011; WORTH et al., 2011). Os estudos *in vivo* estão sendo desencorajados pela EC e somente são solicitados após avaliação da real necessidade (EC, 2011).

No Brasil, muito deve ser avançado com relação à exigência da aplicação e validação do modelo *(Q)SAR*. Atualmente, são recebidos relatórios oriundos de sistemas especialistas como *DEREK*, *TOPKAT*, *QSARToolbox*, *MultiCase* e outros disponíveis e amplamente citados na literatura (KLINK; MEADE, 2003; MOMBELLI; DEVILLERS, 2010; TEBBY; MOMBELLI; PANDARD, 2011; WORTH et al., 2011 a; ZVINAVASHE; MURK; RIETJENS, 2008). No entanto, ainda nenhum estudo de validação ou consideração referente à confiabilidade do alerta gerado por esses sistemas especialistas é exigido ou avaliado.

Em contrapartida, a ausência dessas informações sobre a validação dos modelos é compensada por meio da solicitação de estudos agudos e de mutagênese que subsidiam a avaliação por equivalência.

Em uma publicação mais recente (2011), a EC inseriu a abordagem ecotoxicológica na avaliação realizada quando a equivalência não é determinada, após a comparação dos componentes do produto técnico (Fase II). Nessa abordagem as análises de *(Q)SAR* são inseridos de forma mais restrita, considerando a pouca quantidade de modelos desenvolvidos em relação ao grande espectro de grupos taxonômicos. Ainda, é recomendada a utilização de um cálculo que possa estimar a relevância da impureza com base em seu teor no produto técnico (EC, 2011).

A FAO (2010) recomenda a avaliação dos estudos ecotoxicológicos na fase subsequente à comparação da composição quali-quantitativa, considerando o uso pretendido do produto. No Brasil, esses dados devem ser avaliados apenas na Fase III (Quadro 6) (BRASIL, 2002).

A avaliação da não relevância das impurezas é subsidiada, principalmente, pelas análises dos modelos gerados por *(Q)SAR*. Os estudos da Fase III, como os estudos de toxicidade com doses repetidas, de toxicidade sobre o desenvolvimento e reprodução, de neurotoxicidade etc, podem ser solicitados com base nos alertas estruturais ou previsões geradas pelos sistemas especialistas. Esses estudos, no entanto, somente devem ser solicitados se a validade da previsão tiver sido comprovada, ou seja, se existirem evidências de que a impureza possa realmente incrementar o perigo do produto (EC, 2011).

Os alertas estruturais ou as previsões de toxicidade das impurezas, somente devem ser investigados se forem alertas estruturais ou previsões não evidenciados no ingrediente ativo. Se nenhum alerta diferente for gerado, a avaliação da Fase II não prossegue para Fase III.

Na avaliação dos estudos toxicológicos é importante especificar o lote utilizado para a realização dos estudos e, por consequência, se as impurezas novas ou incrementadas foram devidamente quantificadas nesse lote. Essa quantificação é essencial na avaliação, pois somente através dela podemos inferir se existe interferência da impureza na toxicidade do produto (EC, 2011).

O perfil de impureza do lote utilizado para a realização dos estudos toxicológicos deve ser informado, por meio do estudo de cinco bateladas (*five batches*) ou, através de um certificado de análise, *one batch*, para que se possa inferir sobre a influência da impureza de interesse no perfil toxicológico. A ausência dessa informação inviabiliza a avaliação da equivalência (FAO, 2010; EC, 2011).

Conforme as orientações da EC (2011), internalizadas no Brasil, de acordo com a quantidade da impureza declarada pelo registrante são determinados quais estudos devem ser solicitados. Para impurezas novas ou incrementadas abaixo de 1% (p/p), somente estudo da mutagenicidade gênica deve ser solicitado. Outro tipo de estudo que não o de mutagenicidade gênica pode ser solicitado, se houver evidências de que outro é mais apropriado. Assim, para

impurezas acima de 1% (p/p), estas devem ser investigadas por meio dos estudos de genotoxicidade *in vitro*. E, caso os resultados deste teste não sejam, claramente, negativos um estudo de genotoxicidade *in vivo* pode ser solicitado. Ainda, devem ser considerados os estudos de sensibilização dérmica, Dose Letal 50 oral (DL₅₀), ou seja, dose do produto que mata 50% dos animais de experimentação e, estudo relativos à toxicidade do produto sobre a reprodução e desenvolvimento dos fetos. Se a impureza apresentar teores maiores que 5%, estudos a curto prazo (21-90 dias) podem se solicitados (EC, 2011).

No Brasil, considerando os critérios internacionais estabelecidos, houve uma adaptação de forma a atender a legislação com relação aos requisitos de estudos e a disponibilidade e competência laboratorial brasileira. Dessa forma, ao invés de três estudos *in vitro* de genotoxicidade, como recomendado na EC, é solicitado apenas um estudo de mutagenicidade em micronúcleos, que equivale ao estudo de genotoxicidade *in vivo*, solicitado pelas autoridades europeias (BRASIL, 2002; 1992).

Dessa forma, a comparação com o produto de referência é realizada, somente após verificar que os estudos toxicológicos em animais, entregues para a avaliação da Fase II, foram bem conduzidos, ou seja, que (i) estão de acordo com os *guidelines* internacionalmente reconhecidos, como os elaborados pela *OECD*, EUA, Japão, EC, etc; (ii) os mesmos foram realizados em conformidade com as BPL; e (iii) foram conduzidos com lote com pureza e com perfil de impureza adequados.

No Brasil, para a avaliação da Fase II os estudos toxicológicos, quando solicitados e cujos resultados são dados numéricos (como por exemplo valores de DL₅₀ oral, de DL₅₀ dérmica e, de CL₅₀ inalatória), devem ser comparados com o produto de referência e estes não devem ultrapassar o fator 2. Ou seja, o resultado obtido no estudo toxicológico do produto que solicita a equivalência não deve ser menor que o quociente da razão entre o resultado do estudo do produto de referência e o fator 2. Assim, por exemplo, se o produto de referência tem um valor de DL₅₀ oral de 500mg/kg de peso corpóreo, o produto que solicita equivalência, será considerado equivalente somente se sua DL₅₀ oral não for menor do que 250mg/kg de peso corpóreo (BRASIL, 2002).

No caso de estudos que a resposta resultante é somente positivo ou negativo, o resultado obtido para o produto que solicita equivalência não pode ser mais restritivo que o produto de referência (BRASIL,2002).

Quadro 6 – Algumas diferenças encontradas relacionadas às exigências de estudos nas fases, respectivamente, I, II e III de avaliação de um produto técnico equivalente no Brasil, na EC e na FAO, sendo Imp a impureza contida na amostra.

Fases da avaliação	Estudos requeridos em cada Fase		
	BRASIL(2006)	EC (2011)	FAO(2010)
FASE I	-Informações e estudos físico-químicos	-Informações e estudos físico-químicos	-Informações e estudos físico-químicos -Mutagênese <i>in vitro</i> em bactérias
FASE II	- <i>(Q)SAR</i> (em qualquer nível de imp nova ou incrementada); - Mutagênese <i>in vitro</i> em bactérias (0,1%>Imp<1%); -Teste de micronúcleo; (Imp>1%) -Teste de sensibilização dérmica; (Imp>1%) -Toxicidade oral aguda; (Imp>1% e sempre que não houver dados agudos disponíveis para a impureza e, quando houver, o cálculo de incremento de perigo do ingrediente ativo for maior que 10%.)	- <i>(Q)SAR</i> e cálculo da relevância ecotoxicológica da impureza (em qualquer nível de imp nova ou incrementada); - Mutagênese <i>in vitro</i> em bactérias (0,1%>Imp<1%); -Teste de micronúcleo; (Imp>1%) -Teste de sensibilização dérmica; (Imp>1%) -Toxicidade oral aguda; (Imp>1% e sempre que não houver dados agudos disponíveis para a impureza e, quando houver, o cálculo de incremento de perigo do ingrediente ativo for maior que 10%.) - Estudos de toxicidade sobre reprodução e desenvolvimento (Imp>1% considerando dados de exposição do operador, do trabalhador e do consumidor) -Estudos de neurotoxicidade (Imp>1% quando houverem evidências de neurotoxicidade maior que o i.a.) -Estudos em doses repetidas e/ou outros estudos entendidos como pertinentes (Imp>5%)	-Estudos de toxicidade oral aguda; -Estudos de toxicidade dérmica aguda; -Estudo de toxicidade inalatória; -Estudos de irritação/corrosão dérmica e ocular -Estudo de sensibilização dérmica; -Estudos ecotoxicológicos , (quando pertinentes considerando o uso -Estudos com doses repetidas (quando relevantes de acordo com GHS)
FASE III	- Estudos de toxicidade sobre reprodução e desenvolvimento (Imp>1%, se alerta confiável, diferente do ingrediente ativo <i>(Q)SAR</i> for obtido) -Estudos de neurotoxicidade (Imp>1%, quando houverem evidências de neurotoxicidade maior que o i.a. e se alerta confiável, diferente do ingrediente ativo <i>(Q)SAR</i> for obtido) -Estudos em doses repetidas e/ou outros estudos entendidos como pertinentes. -Estudos ecotoxicológicos definidos pela autoridade competente.	- Não evidenciada	- Não evidenciada

Fonte: BRASIL(2006); EC (2011); FAO (2010).

Um resultado positivo para o produto equivalente somente pode ser aceito quando o produto de referência também tenha resultado positivo. Por exemplo, se considerarmos o *endpoint* de sensibilização dérmica, um produto somente pode ser considerado equivalente se:

(i) ambos forem considerados positivos ou negativos, para o *endpoint* de sensibilização dérmica, ou;

(ii) se o produto candidato à equivalência não for considerado sensibilizante dérmico frente a um resultado positivo observado para o produto de referência. Esse critério pode ser utilizado para os outros *endpoints* categóricos, como por exemplo, mutagenicidade.

Com relação aos estudos de toxicidade aguda, onde resultados numéricos são obtidos, há de se considerar para a comparação não somente o fator dois, mas também os níveis de dose utilizados, os sintomas tóxicos e o número de mortes ocorridas (BRASIL, 2002).

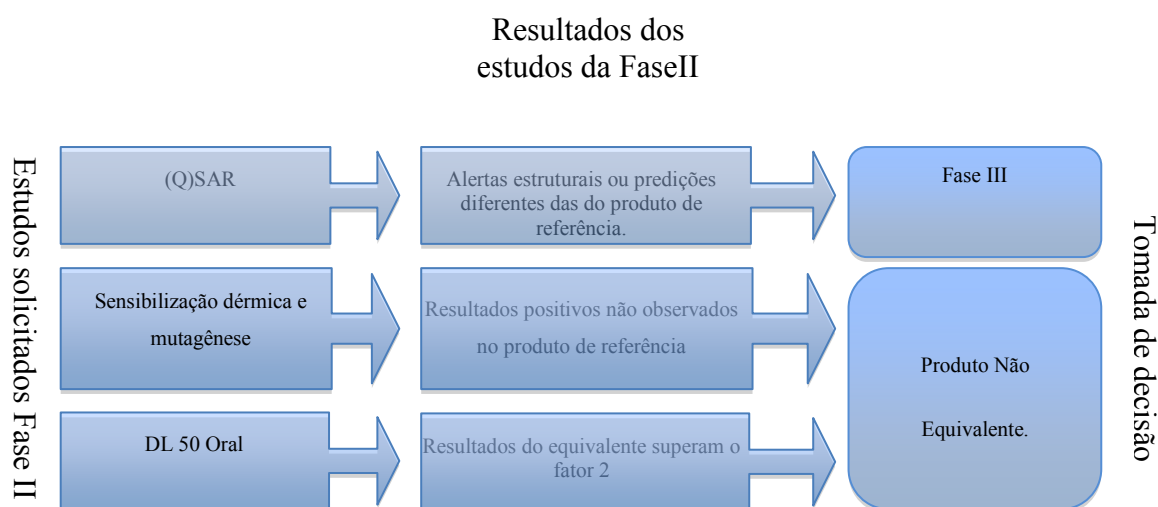
Os protocolos *OECD* vigentes para a determinação ou estimativa da toxicidade aguda oral estipulam o número de animais e tem seus níveis de doses pré-fixadas, ou determinadas, por meio de *softwares*. Situação diferente pode ser observada nos protocolos obsoletos que determinavam a utilização de muitos animais e não estipulavam as doses a serem testadas, ou seja, qualquer dose, considerada adequada pelo diretor do estudo, poderia ser utilizada para a determinação da DL_{50} oral (OECD,2001).

No entanto, o fato de um teste ter sido conduzido com um protocolo obsoleto não invalida seu resultado. A maioria dos produtos técnicos de referência foram testados por meio de protocolos obsoletos. Em contrapartida, os produtos candidatos a equivalentes são testados com os protocolos vigentes. Quando essa diferença de protocolo ocorre, os níveis de doses testados podem ser muito diferentes e superar o fator de 2. E, dessa forma, um julgamento especializado deve ser utilizado para a comparação dos resultados (BRASIL, 2002; EC, 2011).

Os estudos de irritação, respectivamente, ocular e dérmica da Fase II, cujos dados obtidos são subjetivos, os sintomas são avaliados quanto à reversibilidade e à gravidade. Se forem observados sintomas mais graves, ou com diferenças significativas na reversibilidade, os produtos são considerados não equivalentes. Nesse caso, onde nenhum estudo da Fase III pode responder ao *endpoint* irritação, a avaliação é concluída na Fase II, por se considerar que

houve incremento no perigo do produto, o qual não pode ser respondido com estudos crônicos.

Figura 6 - Esquema ilustrativo dos procedimentos utilizados para avaliação da equivalência de produto técnico, fundamentada em estudos de (Q)SAR e toxicológicos da Fase II e os prováveis resultados da comparação entre as previsões/alertas, bem como outros estudos, que poderiam levar a continuidade da avaliação ou conclusão sobre a não equivalência.



Fonte: Adaptado BRASIL (2006)

4.3 Análise da Fase III

Se a equivalência não puder ser determinada na Fase II (Figura 6), a avaliação deve seguir para Fase III, com a solicitação tanto de estudos toxicológicos com doses repetidas, bem como de estudos ecotoxicológicos. Nesta fase, o fator estipulado na legislação, para comparação entre os resultados dos estudos toxicológicos do produto de referência e do candidato a equivalente, também é dois (fator 2) (BRASIL,2002).

São comparados os resultados numéricos dos níveis onde o efeito tóxico, ou adverso, tenha sido observado. Nessa comparação, também deve ser considerado os níveis de dose dos estudos. Isto é feito para que se verifique a adequabilidade da comparação, com relação às diferenças de condução dos estudos, e se os órgãos afetados são os mesmos.

Para os resultados dos estudos ecotoxicológicos deve ser utilizado, de acordo com o Decreto n. 4.074/02, o fator de comparação de cinco (fator 5). A avaliação dos parâmetros ecotoxicológicos está prevista, somente, na Fase III (BRASIL, 2002). Na (EC, 2011), no

entanto, a avaliação ecotoxicológica é realizada após a determinação de não-equivalência química, diferente do observado na legislação brasileira (Quadro 6).

No Brasil, nenhum pleito de registro, até o momento, foi concluído na Fase III. Ou seja, os produtos são deferidos, ou indeferidos, ainda na Fase II (ANVISA, 2012; Acesso em 08 de novembro de 2012). Essa ausência de avaliação dos estudos da Fase III faz com que os produtos equivalentes não sejam avaliados do ponto de vista ecotoxicológico e, as informações ambientais sejam preteridas em relação às de saúde humana. Essa deficiência foi corrigida tanto na *EC* (2011) como na *FAO* (2010) com a atualização de seus guias para avaliação de equivalência.

4.4 Considerações Gerais sobre o processo de avaliação de equivalência

O Brasil vem seguindo a tendência mundial para redução do número dos animais de experimentação e, harmonização de procedimentos para avaliação de produtos químicos, por meio da adoção de *guidelines* e, de guias analíticos de estudos e de qualidade. Nesse sentido, o processo de registro por equivalência vem se aprimorando, no entanto é necessário que o dossiê encaminhado para a avaliação seja pautado no conhecimento técnico e científico.

Verifica-se que os pontos críticos da avaliação estão focados na análise da Fase I. A qualidade do dado analítico e o conhecimento do processo de fabricação do produto são condições necessárias para que se gere um dossiê conciso, cujas informações sejam geradas de forma coerente com o produto que é comercializado.

Além da qualidade dos dados analíticos, devem ser observadas as Boas Práticas Laboratoriais, que agregam confiabilidade e rastreabilidade da informação e do ambiente onde os dados, tanto físico-químicos quanto toxicológicos, são gerados.

Como ponto crítico da Fase II, destaca-se a quantificação das impurezas novas, ou incrementadas no lote utilizado nos estudos toxicológicos, sendo esta uma informação importante na avaliação para que se possa inferir sobre o aumento da toxicidade e se o mesmo foi provocado pelas impurezas.

Devem ser desenvolvidos procedimentos sobre a forma de se exigir e de se avaliar os estudos de *(Q)SAR* considerando que, como estão sendo, atualmente, encaminhados,

nenhum parâmetro de qualidade da predição, ou de validação do modelo, está sendo avaliado. Assim, a avaliação da não relevância da impureza no produto técnico pode estar subestimando o perigo das impurezas. Ademais, produtos que deveriam ser encaminhados para a próxima fase de avaliação, não estão sendo encaminhados, possibilitando a aprovação de produtos de maior perigo, com a avaliação restrita somente aos *endpoints* agudos e de mutagênese, como exigidos na Fase II.

Centenas de produtos técnicos equivalentes já foram colocados no mercado sem a avaliação da Fase III, ou seja, sem a avaliação dos efeitos dos produtos após a exposição crônica, principal via de exposição de agrotóxicos em número de pessoas expostas.

No Brasil, a avaliação ecotoxicológica não é realizada para produtos técnicos equivalentes. A classificação do Potencial Periculosidade Ambiental (PPA) é baseada no produto técnico de referência, ou seja, as impurezas não são avaliadas do ponto de vista ambiental, considerando a defasagem da nossa legislação. No entanto com os instrumentos legais existentes esses poderiam ser solicitados e avaliados.

5 PROPOSTA DE PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO PARA EXIGÊNCIA E AVALIAÇÃO DE ANÁLISES DE (Q)SAR DIRECIONADAS PARA AVALIAÇÃO DE PERIGO DE PRODUTOS TÉCNICOS EQUIVALENTES.

O requisito essencial, dentro da avaliação de um produto técnico equivalente, para a solicitação de um estudo de (Q)SAR é a presença de uma impureza ou mais, novas ou incrementadas, no perfil de impureza do produto técnico equivalente, em relação ao perfil do produto técnico de referência.

Para a verificação da existência dessa(s) impureza(s) em um produto técnico equivalente, uma série de procedimentos analíticos devem ser realizados, assim como vários requisitos regulatórios devem ser cumpridos, como realização dos estudos físico-químicos e toxicológicos sob condições de BPL.

Como mencionado no item 4, a identificação inequívoca das impurezas é condição necessária para a determinação da equivalência química entre os produtos. Isto é, se uma impureza não tiver sua estrutura química elucidada e seus teores bem definidos, a avaliação da equivalência não pode ser realizada, pois sendo a equivalência uma avaliação comparativa, se uma das partes da comparação não for determinada, a comparação não pode ser realizada.

O estudo de (Q)SAR é, atualmente, utilizado de forma suplementar à avaliação da Fase II, que é relativa aos *endpoints* de toxicidade aguda, à sensibilização dérmica e às mutagêneses gênica e cromossômica. Além da utilização suplementar da avaliação da Fase II, a abordagem de (Q)SAR também é utilizada para indicar quais estudos devem ser solicitados na Fase III. Nesta, ocorre a avaliação de *endpoints* determinados com base em estudos toxicológicos crônicos, os quais devem possibilitar a avaliação dos efeitos gerados, pela exposição contínua a um composto em várias doses. O tempo da exposição nos estudos depende do *endpoint* a ser avaliado e pode variar de 21 dias a 2 anos (BRASIL, 1992).

Com base na literatura, anteriormente levantada neste trabalho, verifica-se que, para a utilização da abordagem metodológica (Q)SAR na avaliação de equivalência, o primeiro requisito a ser cumprido, ainda na Fase I, é a identificação estrutural da impureza. Esse item é de grande relevância, haja vista que a hipótese principal assumida é de que determinada atividade biológica está relacionada quali-quantitativamente à estrutura de um composto. A

mudança de um grupo funcional, a presença de tautômeros, de grupo ionizável ou a adição de um grupo metila pode alterar o poder de predição de um modelo, como anteriormente discutido.

Os princípios *OECD*, discutidos no item 3, estão intimamente relacionados à identificação estrutural inequívoca dos compostos utilizados na construção do modelo de *QSAR*. As mesmas precauções devem, também, ser tomadas em relação aos compostos (impurezas e análogos) cujos *endpoints* serão preditos, pois uma predição pode ter sido feita de acordo com os princípios *OECD*, mas não ser adequada à avaliação, por não ser o composto que realmente deveria ser avaliado. Por exemplo, se na equivalência uma impureza nova, ou incrementada, for indicada para ser avaliada em um estudo de (*Q*)*SAR*, mas não tenha sido corretamente identificada, o resultado da avaliação pode ser diferente do que realmente deveria ocorrer e a influência da impureza pode não ser avaliada.

Um exemplo ilustrativo da importância deste aspecto é apresentado a seguir. Uma estrutura cíclica, é identificada, erroneamente, como linear, por meio do seu espectro de massas. No entanto, mesmo que a estrutura linear tenha obtido uma predição correta por um modelo alcançando altos valores de preditividade, a estrutura que deveria ter sido avaliada é, na verdade, a cíclica. E, assim, este composto pode não estar dentro do domínio de aplicabilidade do modelo e/ou possuir outro mecanismo de ação e, como resultado, pode-se estar gerando uma avaliação da equivalência errada desde a Fase I.

Desse modo, o erro na atribuição e/ou na escrita da estrutura molecular da impureza pode, ainda, além de gerar estudos de (*Q*)*SAR* inválidos, gerar desnecessariamente estudos toxicológicos com animais, superestimar o perigo ou, reciprocamente, não gerar nenhum estudo e o perigo ser subestimado.

Com base nas questões levantadas sobre a avaliação da equivalência, constata-se que o peso da evidência deve ser considerado já na Fase I, na identificação inequívoca das impurezas, ou seja, na utilização de todas as informações (processo de síntese e informação teórica das impurezas) e técnicas analíticas necessárias para identificação e quantificação das impurezas de interesse, para que a integração dos testes seja uma alternativa viável também para essa aplicação regulatória.

De acordo com alguns autores (WORTH et al., 2011c), para a avaliação da preditividade de um modelo de (Q)SAR pelo menos dois compostos análogos devem ser, paralelamente, analisados e, em geral, de dois a cinco análogos são suficientes para esta avaliação.

Os análogos devem ter os respectivos valores do *endpoint* bem definidos, de acordo com o primeiro princípio *OECD*, ou seja, terem sido determinados utilizando protocolos internacionais reconhecidos e não possuírem um intervalo muito amplo ou, que demonstrem atividade nula, ou baixa (DEARDEN; CRONIN; KAISER, 2010) .

Quando os resultados forem qualitativos (quantais), pelo menos um exemplo de análogo com resultado positivo e outro com negativo devem ser inseridos na avaliação. O análogo pertencer à série de treinamento do modelo é um indicativo de que a impureza está dentro do espaço de predição do modelo e isso agrega confiança à predição (WORTH et al., 2011c).

Na avaliação da equivalência já se exige que a predição de toxicidade seja feita não somente com a impureza, mas também com o ingrediente ativo, para avaliar se a predição obtida para o ingrediente ativo é similar à obtida pela impureza, quando a impureza possui estrutura química parecida com o ingrediente ativo. A predição de um *endpoint* para a impureza, não observada para o ingrediente ativo pode indicar que os compostos agem no sistema biológico de forma diferente, ou seja, suas toxicidades não são aditivas. Isto é, possuem mecanismos de ação diferentes ou um dos dois compostos não estão dentro do domínio de aplicabilidade do modelo utilizado.

Alguns sistemas especialistas já trazem incorporados em seus algoritmos essa abordagem de busca de análogos (ex. *CAESAR*, *TOPKAT*, *(Q)SAR OECD Toolbox*). Quando essa abordagem não estiver incorporada sugere-se que os análogos sejam buscados em outras bases como *Pubchem* (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), *ChemSpider*(<http://www.chemspider.com>), *AMBIT* (<http://ambit.sourceforge.net/intro.html>) e *AIM* (<http://www.epa.gov/oppt/sf/tools/aim.htm>) (Worth et al., 2011c). Pode-se pesquisar ainda pela classe de uso em <http://www.alanwood.net/pesticides/> .

Compostos análogos podem ser escolhidos com base na sua similaridade estrutural. Assim, Y. Martin (MARTIN et al., 2002 b) observou que para compostos com atividade

conhecida, apresentando similaridade $\geq 0,85$ (de acordo com o coeficiente de Tanimoto) tem 30% mais de chance de possuírem atividades semelhantes do que aqueles escolhidos aleatoriamente. No entanto, os compostos devem ser tão similares quanto for necessário para haver uma expectativa de efeito similar (OECD, 2007).

A identificação da similaridade do modo/mecanismo de ação de um composto pode ser feita por meio da identificação de um alerta estrutural, definido anteriormente neste trabalho, ou, por meio da identificação do composto em uma categoria química já conhecida.

Uma categoria química é definida (ECHA, 2008) por um grupo de substâncias com propriedades físico-químicas, toxicológicas e ecotoxicológicas que, provavelmente, são semelhantes ou, seguem um padrão regular de atividade, como resultado de sua similaridade química. Algumas categorias químicas já foram definidas pela *US EPA* (<http://www.epa.gov/oppt/newchemicals/pubs/chemcat.htm>, acessado em 17/01/2013) e, outras estão disponíveis no *(Q)SAR ToolBox*.

Após a escolha dos compostos análogos à impureza de interesse, é necessário buscar informações relacionadas aos respectivos *endpoints*. Essas informações são necessárias e devem estar disponíveis para avaliação do perigo do agrotóxico, bem como ser dados de respaldo para subsidiar a avaliação da impureza. Essas informações podem ser relacionadas às propriedades físico-químicas, à possível rota de metabolização e aos metabólitos que podem ser gerados. Além disso, essas informações podem ajudar a elucidar se ambos, impureza e análogos, possuem o mesmo modo/mecanismo de ação.

Conforme já mencionado no item 4, o principal objetivo da avaliação da Fase II é verificar a influência da impureza na toxicidade do produto técnico. Essa influência, se existir, pode ser observada por meio da comparação entre os perigos dos produtos técnicos envolvidos: o candidato a equivalente e o produto de referência.

Caso fique demonstrado que houve aumento do perigo, aqui entendido como o aumento superior a um fator de 2 na comparação dos resultados dos estudos toxicológicos ou, ainda, quando resultados não-numéricos diferentes são obtidos (a não ser que menos restritivos para o produto candidato a equivalente) os produtos não podem ser considerados equivalentes.

Conforme a Portaria SNVS/MS n. 03/92, os *endpoints* necessários à avaliação de um produto técnico são, a seguir, citados: toxicidade aguda pelas vias inalatória, dérmica e oral; irritação dérmica e ocular; sensibilização dérmica; mutagenicidade gênica e cromossômica; toxicidade a longo prazo, carcinogenicidade, toxicidade à reprodução, toxicidade ao desenvolvimento e neurotoxicidade. Outros *endpoints* estão sendo inseridos na legislação, como imunotoxicidade e desregulação endócrina, por meio da substituição da legislação que ainda está em discussão (ANVISA, 2011).

A estratégia de integração de testes *in vivo* e *in vitro* já tem sido uma abordagem desenvolvida (em discussão interna, não publicada) por meio da nova proposta de legislação para avaliação toxicológica de agrotóxicos (ANVISA, 2011). No entanto, a mesma não previu, quando da sua consulta pública, a utilização da abordagem metodológica de *(Q)SAR* ou de outros métodos computacionais que possam prever modo de ação, como o modelo *PBPK* (*Physiologically Based Pharmacokinetic*) (USEPA, 2006).

O pacote de estudos toxicológicos necessários para a avaliação de um produto técnico equivalente é reduzido. Os estudos devem ser solicitados a medida da necessidade regulatória, com base nos teores determinados da impureza nova/incrementada (BRASIL, 2002). No entanto, para assegurar que o perigo dos produtos são equivalentes é necessário considerar os mesmos *endpoints* avaliados para o produto técnico de referência.

Considerando os *endpoints* necessários para a avaliação de um produto técnico, é necessário que haja avaliação correspondente para todos os *endpoints* acima citados, ou pelo menos, para todos os possíveis e disponíveis. Alguns deles, no entanto, devem ser comprovados por estudos *in vitro* como os de mutagênese gênica e cromossômica, que já possuem testes alternativos validados pela *OECD* (<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforhetestingofchemicals.htm>, acesso em 19 de fevereiro de 2013).

Atualmente, conforme Decreto n. 4.074/02, os *endpoints* de toxicidade aguda, mutagênese e sensibilização dérmica e os indicados pelos alertas estruturais do *(Q)SAR* são avaliados.

A maioria dos sistemas especialistas, que é a principal ferramenta utilizada para atender às exigências relacionadas a estudos de *(Q)SAR*, identificam o *endpoint* que deve ser

investigado nas fases II ou III, gerando alertas estruturais e predições de modelos de *(Q)SAR*. No entanto, deve ser comprovado que todos os *endpoints* disponíveis no sistema preditivo foram corretamente avaliados, para evitar que resultados diferentes sejam obtidos para um mesmo composto. Ou seja, o *endpoint* a ser predito, deve estar identificado, bem como os motivos que levaram a obtenção do *endpoint* devem ser discutidos pelo avaliador. Para que isso ocorra, a documentação gerada com os dados imputados da predição deve ser detalhada o suficiente para permitir que outro avaliador possa obter o mesmo resultado, se desejar.

Informações sobre o domínio de aplicabilidade do modelo preditivo deve ser descrito e demonstrado, sempre que possível. Para sistemas especialistas com base estatística ou híbridos, os dados de validação do modelo utilizado devem ser apresentados ou referenciados, sempre que disponíveis.

O uso de mais de um tipo de abordagem *(Q)SAR*, *consensus* ou em bateria, pode agregar valor preditivo. E, em situações onde as predições e as correspondentes fundamentações teóricas estão em consenso, maior confiança pode ser inferida (KRUHLAK et al., 2012).

Na determinação da equivalência entre produtos técnicos, mais que um sistema especialista pode ser utilizado para a predição da impureza, do ingrediente ativo e dos análogos. No entanto, para que essa abordagem seja utilizada os resultados preditivos pelos sistemas devem ser uniformizados em um único tipo de informação, se necessário. Alguns autores, (WORTH et al., 2011), sugeriram as seguintes interpretações de acordo com os resultados obtidos para alguns sistemas especialista (Quadro 7). Essas foram propostas com base nos termos “ativo”; “equivoco “ e “não-ativo “. No entanto, outros termos podem ser utilizados para a interpretação dos dados, desde que possam servir para a classificação dos compostos em todos os modelos, incluindo dados numéricos que possibilitem ponderação numérica (ELLISON et al., 2010).

A integração das predições de diferentes modelos se baseia no peso da evidência. Quanto mais preditivo for o modelo, ou seja, quanto mais resultados verdadeiros positivos ele obtiver, maior confiança ou maior peso da evidência pode ser agregada.

As predições para o ingrediente ativo e para os análogos, que são compostos que devem ter o *endpoint* predito bem definido, servem para avaliar quantitativamente o número

de resultados verdadeiros positivos/negativos e falsos negativos/positivos. Da mesma forma, quanto maior o número de predições verdadeiras, maior o peso da evidência.

Por exemplo, se cinco compostos, forem submetidos a um determinado sistema especialista, sendo três mutagênicos e dois não mutagênicos e observa-se que 2 foram preditos corretamente e 3 não. Constatase, então, que o peso da evidência não suporta as predições realizadas pelo sistema, para esse *endpoint*, pois ele obteve 3 resultados falsos contra 2 resultados positivos.

Essa mesma consideração, pode ser feita para comparação entre os sistemas, desde que as predições tenham o mesmo nível de confiança. Assim, por exemplo, se ambos estejam validados ou, então, apresentem dados sobre DA e/ou mecanismo de ação.

Quadro 7 - Exemplo das possíveis interpretações das predições de um *endpoint* genérico feitas por alguns sistemas especialistas, *DEREK*, *CAESAR*, *TOPKAT* e *ToxBox*, respectivamente, com o objetivo de uniformizar as predições para possibilitar a avaliação em bateria de vários sistemas especialistas, com o intuito de aumentar a confiança da predição

Resultado predito	Interpretação uniformizada
DEREK	
Certo	Ativo
Provável	Ativo
Possível	Ativo
Duvidoso	Equívoco
Improvável	Não-Ativo
Impossível	Não-Ativo
Aberto	Não-Ativo
Contraditório	Não-Ativo
Nada a reportar	Não-Ativo
CAESAR	
Endpoint positivo	Ativo
Suspeito	Equívoco
Endpoint negativo	Não-Ativo
TOPKAT e ToxBox	
OPS ou Probabilidade > 0.7	Ativo
0,3<OPS ou Probabilidade>0.7	Equívoco
OPS ou Probabilidade<0.3	Não-Ativo

Quando os resultados obtidos pelos sistemas forem equívocos, outros dados devem ser incluídos, entre eles, dados sobre os mecanismos de ação, o metabolismo e, ainda, as respectivas propriedades físico-químicas, para que seja possível a avaliação do peso da evidência (AHLERS; STOCK; WERSCHKUN, 2008).

A utilidade de um modelo de *(Q)SAR* e, em particular, a sua adequação, somente pode ser considerada no contexto de sua aplicação específica. Assim, para fins regulatórios a utilidade e/ou adequação de um modelo de *(Q)SAR* deve considerar tanto o propósito regulatório para o qual a predição está sendo utilizada bem como as consequências de se obter uma predição não válida (WORTH et al., 2011). Isso implica, que não existe um procedimento padrão para realizar uma avaliação da capacidade preditiva do modelo em todas as situações, o avaliador sempre deve considerar as outras evidências para chegar as conclusões necessárias ao propósito regulatório.

No caso da avaliação da equivalência, o propósito é determinar se a impureza pode agregar um perigo maior ao produto técnico do que aquele já determinado como referência. A *FAO* (2010) e a *EC* (2011) sugerem que a interferência da impureza no produto técnico não deve ser maior do que 10% e, dessa forma, sugere um cálculo para verificação de incremento para *endpoints* quantitativos (Anexo I).

Considerando o acima exposto e a necessidade de elaboração de novo procedimento propõe-se, incluir:

- (i) o aumento do número de compostos preditos de dois, impureza e ingrediente ativo, para quatro, impureza e ingrediente ativo e no mínimo mais dois análogos, para se ter uma idéia sobre o domínio de aplicabilidade do modelo e utilização da abordagem do peso da evidência;
- (ii) o aumento do número de sistemas especialistas utilizados de um para dois, ou três quando as predições não estiverem em consenso, com o objetivo de melhorar a confiança na preditividade;
- (iii) a incorporação de um formato de apresentação dos Relatórios de Predição(RP);
- (iv) a solicitação de informações sobre a validação dos modelos utilizados nas predições por meio da elaboração do Relatório de Validação (RV) ou do *QSAR Model Report Format (QMRF)*, disponível no inventário da *EC*;

- (v) solicitações de informações sobre possíveis metabólitos formados, respectivamente, pelo ingrediente, impureza e análogos, sempre que disponíveis;
- (vi) testes de irritação, respectivamente, dérmica e ocular com base nos teores das impurezas;
- (vii) introduzir a abordagem do peso da evidência na avaliação de produtos técnicos equivalentes.

Segere-se que essas proposições sejam incorporadas ao procedimento já existente e aprovado no CTA conforme disposto no Anexo IV.

6 TENTATIVAS DE CONSTRUÇÃO DE MODELOS DE (Q)SAR

A construção de modelos de *QSAR* é geralmente proposta para auxiliar no desenvolvimento de novas moléculas que possuem, potencialmente, atividade biológica semelhante às moléculas com atividades biológicas já estabelecidas. Muitas vezes, devido a necessidade de se eliminar algum efeito adverso ou potencializar uma determinada atividade biológica de interesse.

Geralmente, para a construção de um modelo de *QSAR* usando, por exemplo, a abordagem de extratermodinâmica de Hansch, são sintetizadas séries congeneres de compostos com determinada atividade biológica (SELASSIE & VERMA, 2010). Baseado em uma estrutura comum, diversos compostos com diversos substituintes são adicionados para a verificar sua influência na atividade biológica a ser estudada.

Essas séries de compostos devem ser identificadas por metodologia analíticas e suas propriedades físico-químicas e suas atividades biológicas de determinadas.

Para fins regulatórios, essas séries podem não ser adequadas considerando que geralmente, apenas uma atividade de interesse é selecionada e não está associada a nenhum endpoint regulatório como mutagenicidade, irritação e sensibilização dérmica, etc (BRASIL, 1990). No entanto, as mesmas podem ser utilizadas como forma de indicar um determinado modo/mecanismo de ação.

Nesses exemplos, apresentados no Apêndice J, foram discutidas e avaliadas duas tentativas de obtenção de modelos de *QSAR*. O primeiro basea-se em um endpoint regulatório e utiliza-se de séries aleatórias, originalmente não planejadas para gerar modelos *QSAR*. O segundo, basea-se em séries de compostos sintetizados com o objetivo de avaliar a eficiência de determinados compostos. Utiliza-se, portanto, de séries planejadas para gerar modelos de *QSAR*.

Para tanto, foram utilizados dados obtidos em bases de dados de estudos toxicológicos, softwares que fazem previsões como *ACDLabs*, *Moka 2.0.1*, *Volsurf* e *E-Dragon 1.0* e da literatura (ARNOLDI et al., 2000;2007).

A partir dos exemplos apresentados pode se inferir que a construção de um modelo *(Q)SAR* não é uma tarefa fácil e depende de dados representativos para uma determinada atividade biológica e que possam ser devidamente tratados. A robustez de um modelo depende dessa qualidade dos dados. A transparência do algoritmo também é condição essencial para sua aceitabilidade, assim como sua praticabilidade depende da finalidade a que se propõe.

Além disso, um modelo construído para uma finalidade regulatória deve dispor de dados suficientes para que seja comprovada sua validade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da abordagem de *(Q)SAR* na avaliação toxicológica de compostos químicos é promissora, pois pode ser fundamentada em dados experimentais já gerados para animais e compilados em diversas bases de dados públicas (ou comerciais) e na utilização de ferramentas computacionais, que, ultimamente, tem sido muito desenvolvidas em todas as áreas do conhecimento.

O fácil acesso aos dados e ferramentas disponíveis possibilita a redução do número de animais testados e, conseqüentemente, um baixo custo para o desenvolvimento de modelos de *(Q)SAR*, para predição de toxicidade, tornando-os uma abordagem muito atrativa aos setores interessados como academia, indústria e agências reguladoras.

No entanto, para que essa abordagem seja utilizada de forma transparente e clara, alguns princípios, aqui denominados de princípios *OECD*, foram desenvolvidos pela academia, juntamente, com o setor regulador e regulado, para que os modelos fossem construídos, utilizados e aceitos por todos os interessados (*OECD*, 2007).

Um modelo de *(Q)SAR* construído segundo esses princípios *OECD* facilita a sua aceitação, apesar de não ser, ainda, condição essencial para a sua aceitação, por considerar questões de propriedade dos dados e informações.

Verificou-se, no entanto, que mesmo que todos os princípios não sejam totalmente satisfeitos, se a confiabilidade da predição puder ser de alguma forma avaliada, essas informações podem ser utilizadas para a avaliação da possível toxicidade de compostos ainda não testados, quando analisada de forma integrada com outros resultados oriundos de testes realizados em animais (testes padrão) ou *in vitro*.

Diante dessa possibilidade, foi proposto um aprimoramento na forma de utilização da abordagem de *(Q)SAR*, aplicada a avaliação de produto técnico equivalente.

As proposições feitas agregam informações anteriormente não solicitadas que, no entanto, podem tornar a avaliação da equivalência mais consistente, possibilitando que, nesse tipo de avaliação, seja atingido um patamar de avaliação de informações ainda não alcançado por muitos países.

Além disso, o entendimento da base teórica das abordagens *(Q)SAR* e a experiência alcançada na sua utilização pode possibilitar sua aplicação também em outras áreas de avaliação. Essas aplicações ainda não estão desenvolvidas no Brasil, como alguns tipos de análise de risco, na classificação e rotulagem de outros compostos, não agrotóxicos, e quiçá na avaliação da grande maioria dos compostos químicos utilizados no Brasil, como ocorre em outros países.

É importante ressaltar que a área de toxicologia preditiva regulatória está em desenvolvimento, tanto no Brasil como no mundo. As tecnologias estão se aprimorando, em um prazo muito curto de tempo, na busca de novas e melhores soluções que superem o desafio regulatório: avaliar cada vez mais compostos, com menos animais, menos custos e garantindo a segurança da saúde e do meio ambiente.

Dessa forma, o procedimento aqui proposto (Apêndice I) para avaliação de produtos técnicos equivalentes deve ser constantemente revisado, para se manter atualizado frente as novas tecnologias e métodos desenvolvidos, principalmente, com relação a inclusão da avaliação ecotoxicológica, não inclusa nessa revisão, no entanto, considerada, do ponto de vista regulatório, de caráter emergente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACD/ChemSketch Freeware, version 10.00, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2012

ACD/ChemSketch, version 9.00, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, www.acdlabs.com, 2012

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA. **Guia para Qualidade em Química Analítica**: Uma assistência a acreditação, Volume 1, 1ª edição, Abril de 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA. **Planilhas de situação de pleitos de registros de produtos**, 2012. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Situacao+de+Pleitos+de+Registro>> Acesso em: 28 de março de 2012

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, ANVISA. Consulta Pública no. 02, de 25 de janeiro de 2011, Proposta de Regulamento Técnico, para critérios e exigências para avaliação toxicológica de agrotóxicos, componentes e afins. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, publicado em 28 de janeiro de 2011. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/regulacao+sanitaria/assuntos+de+interesse/consultas+publicas/assuntos+de+interesse/consultas+publicas+encerradas/2011/2011012702>> Acesso em: 18 de fevereiro de 2013.

ALOGPS 2.1.; disponível em <<http://www.vcclab.org/lab/alogps/>> Acesso em: fevereiro de 2013

AHLERS, J.; STOCK, F.; WERSCHKUN, B. Integrated testing and intelligent assessment—new challenges under REACH. **Environmental Science and Pollution** v. 15, p. 565-572, 2008.

ANZALI, S.; *et al.* The Use of Self-Organizing Neural Networks in Drug Design, **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v. 9-11, p. 273-299, 1998.

ARNOLDI, A et al. Synthesis, fungicidal activity, and QSAR of a series of 2-dichlorophenyl-3-triazolylpropyl ethers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2547-55, jun. 2000.

ARNOLDI, A. et al. Synthesis and antifungal activity of a series of N-substituted [2-(2,4-dichlorophenyl)-3-(1,2,4-triazol-1-yl)]propylamines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 20, p. 8187-92, 3 out. 2007

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA, ABIQUIM. **O QUE É O GHS ?** São Paulo: [s.n.], 2005.

ATKINSON, A.C. **Plots, Transformations and Regression**. Oxford, Clarendon Press, 1985.

AUSTRALIAN PESTICIDE AND VETERINARY AUTHORITY, APVMA. **Agricultural Manual of Requirements and Guidelines** rev 04 2007. Disponível em <http://www.apvma.gov.au/morag_ag/vol_3/part_02_chemistry.php> Acesso em: 28 de março de 2012.

BENFENATI, E. The specificity of the QSAR models for regulatory purposes: the example of the DEMETRA project. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 18, n. 3-4, p. 209-213, 2007.

BENFENATI, E. Predicting toxicity through computers: a changing world. **Chemistry Central Journal**, v. 7, p. 1-7, 2007.

BENFENATI, E.; BENIGNI, R. Predictive Models for Carcinogenicity and Mutagenicity: Frameworks, State-of-the-Art, and Perspectives. **Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews**, v. 27, n. 2, p. 57-90, 2009.

BENIGNI, R. et al. **The Benigni/Bossa rulebase for mutagenicity and carcinogenicity-a module of Toxtree**. Ispra: [s.n.], 2008.

BENIGNI, R. et al. Structural analysis and predictive value of the rodent in vivo micronucleus assay results. **Mutagenesis** v. 25, n. 4, p. 335-341, 2010.

BENIGNI, R.; BOSSA, C. Structure alerts for carcinogenicity, and the Salmonella assay system: A novel insight through the chemical relational databases technology. **Mutation Research**, v. 659, p. 248-261, 2008.

BILLIN, disponível em < <http://www.kubinyi.de/bilin-program.html>> Acesso em : 10 de fevereiro de 2013

BRASIL, Lei n. 7802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos da embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União; Poder executivo**, de 12 de julho de 1989. Disponível em <http://www.planalto.gov.br/Ccivil_03/Leis/L7802.htm> Acesso em: 10 de novembro 2011

BRASIL, Decreto n. 4074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União; Poder Executivo**, de 08 de janeiro de 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2002/D4074.htm> Acesso em: 10 de novembro de 2011

BRASIL, Decreto n. 5981, de 06 de dezembro de 2006. Dá nova redação e inclui dispositivos ao Decreto n° 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei n° 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e

rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 07 de dezembro de 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Decreto/2006/D5981.htm> Acesso em: 10 de novembro de 2011

BRASIL, Portaria n° 03/MS/SNVS de 16 de janeiro de 1992. Diretrizes e exigências referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins. **Diário Oficial da União**; Poder executivo, de 16 de janeiro de 1989. Disponível em <<http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/anvisa/16889-3.html>> Acesso em: 19 de janeiro de 2013.

BRASIL, Portaria Normativa IBAMA n° 84 de 15 de outubro de 1996. **Diário Oficial da União**; Poder executivo, de 18 de outubro de 1986. Disponível em <http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf> Acesso em: 19 de janeiro de 2013.

CASSANO, A. *et al.* CAESAR models for developmental toxicity. **Chemistry Central Journal**, v. 4 Suppl 1, p. S4, jan. 2010.

CHATTERJEE, S; PRICE, B. **Regression Analysis by Example**, Ed John Wiley & Sons, New York, Capítulo 1, 1977. 228p

COMITÊ TÉCNICO DE ASSESSORAMENTO EM AGROTÓXICOS, CTA. **Orientação Técnica sobre laudo de cinco bateladas e critérios para elaboração da declaração do limite mínimo de Ingrediente Ativo e limites máximos de impurezas** Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/760_orientacao_tecnica_5_bateladas.pdf> Acesso em: 28 de março de 2012.

COMITÊ TÉCNICO DE ASSESSORAMENTO EM AGROTÓXICOS OFÍCIO, CTA. **Ofício n° 01 de 21 de setembro de 2011** Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/agrotoxicos/CTA/Orientação%20sobre%20Procedimentos%20Técnicos%20e%20Administrativos%20-%20Equivalência.pdf> Acesso em: 28 de março de 2012.

CONSONNI, V.; BALLABIO, D.; TODESCHINI, R. Comments on the definition of the Q2 parameter for QSAR validation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 7, p. 1669-78, jul. 2009.

COSTANZI, S.; TIKHONOVA, I. Ligand and structure-based methodologies for the prediction of the activity of G protein-coupled receptor ligands. **Journal of Computational-aided Molecular Design**, v. 23, n. 11, p. 747-754, 2009.

CRIVORI, P., CRUCIANI, G., CARRUPT, P.-A. E TESTA, B.. Predicting Blood-Brain Barrier Permeation from Three-Dimensional Molecular Structure. **Journal of Medicine Chemistry**, 43 (11), 2204-2216, 2000.

CRONIN, M.; JAWORSKA, J. Use of QSARs in International Decision-Making Frameworks to Predict Health Effects of Chemical Substances. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 10, p. 1391-1401, 2003.

CRONIN, M.; LIVINGSTONE, D. A. The Use by Governmental Regulatory Agencies of Quantitative Structure-Activity Relationships and Expert Systems to Predict Toxicity. *In*: CRONIN, MARK T.D.(LIVERPOOL JOHN MOORES UNIVERSITY, U. (Ed.). **Predicting Chemical Toxicity and Fate**. First Edit ed. Liver: CRC Press, 2004. p. 445.

CRUCIANI, G., CRIVORI, P., CARRUPT P.A E TESTA, B.. Molecular Fields in QuantitativeStructure-Permeation Relationships: the VolSurf Approach. **Journal of Molecular Structure**: THEOCHEM 503, 17-30, 2000.

DAYLIGHT, **Base de Dados**, Chemical Information System Inc. disponível em <<http://www.daylight.com/dayhtml/doc/theory/theory.smiles.html> > Acesso em: 17 de janeiro de 2013.

DEARDEN, J. C.; CRONIN, M.; KAISER, K. How not to develop a quantitative structure – activity or structure – property relationship (QSAR / QSPR). **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 20, n. 3-4, p. 241-266, 2010.

DEBELJAK, Z. *et al.* Novel approach to evolutionary neural network based descriptor selection and QSAR model development. **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v. 19, n. 12, p. 835-55, dez. 2005.

DEVILLERS, J.; DEVILLERS, H. Prediction of acute mammalian toxicity from QSARs and interspecies correlations. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 20, n. 5-6, p. 467-500, jul. 2009.

DOWEYKO, A. M. QSAR: dead or alive? **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v. 22, n. 2, p. 81-9, fev. 2008.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY- EPA- Summary of the Toxic Substances Control Act, 1976 , disponível em <<http://www.epa.gov/lawsregs/laws/tsca.html>> acesso em: 28 de janeiro de 2013.

EUROPEAN CENTRE FOR ECOTOXICOLOGY AND TOXICOLOGY OF CHEMICAL ECETOC. **Technical Report No . 89:(Q)SARs: Evaluation of the commercially available software for human health and environmental endpoints with respect to chemical management applications**. Brussels: [s.n.], 2003. 164 p.

EUROPEAN CHEMICAL AGENCY, ECHA. **Guidance on Information Requirements and Chemical Safety Assessment**. Chapter R. 6: QSARs and grouping of chemicals. [S.l: s.n.], Mai 2008. 134 p

EUROPEAN COMISSION, EC. **Applicability of QSAR Analysis to the Evaluation of the Toxicological Relevance of Metabolites and Degradates of Pesticide Active Substances for Dietary Risk Assessment**. Ispra-Italy: [s.n.], 2010. 311 p

EUROPEAN COMMISSION, EC. **Guidance Document on the Assessment of the Equivalence of Technical Materials of Substances Regulated under Council Directive 91/414/EEC**, 2011 Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/guidance/wrkdoc23_en.pdf > Acesso em: 28 de setembro de 2011.

EUROPEAN COMMISSION ,EC. **Guidance for generating and reporting methods of analysis in support of pre- and post-registration data requirements for Annex II (part A,Section 4) and Annex III (part A, Section 5) of Directive 91/414**. Technical Material and Preparations: SANCO/3030/99 rev.4 de 11/07/00. Disponível em <http://ec.europa.eu/food/plant/plant_protection_products/approval_active_substances/docs/wrkdoc13_en.pdf> Acesso em: 28 de março de 2012.

ELLISON, C. M. *et al.* Using In Silico Tools in a Weight of Evidence Approach to Aid Toxicological Assessment. **Molecular Informatics**, p. 22-23, 2010.

FJODOROVA, N.; NOVICH, M. Directions in QSAR modeling for regulatory uses in OECD member countries, EU and in Russia. **Journal of Environmental Science and Health, Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology**, n. 26, p. 201-236, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, FAO. **Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides**, 2011 Disponível em <<http://www.fao.org/docrep/007/y4353e/y4353e00.htm>> Acesso em: 28 de janeiro de 2012.

FORREST, S. Genetic Algorithms: Principles of Natural Selection Applied to Computation, **Science**, v.261, p.872-885, 1993.

FRIEDERICHS, M.; FRÄNZLE, O; SALSKI, A. Fuzzy Clustering of Existing Chemicals According to Their Ecotoxicological Properties, **Ecological Modelling**, v.85, p.27-40, 1996.

GARTHOFF, B. Alternatives to animal experimentation: The regulatory background. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 207, p. 388-392, 2005.

GEDECK, P.; ROHDE, B; BARTELS, C. QSAR – How good is it in practice? Comparison of descriptor sets on an unbiased cross section of corporate data sets, **Journal of Chemical Information and Modeling**, v.46, p. 1924–1936, 2006.

GINI, G.; GARG, T.; STEFANELLI, M. Ensembling regression models to improve their predictivity: a case study in qsar (quantitative structure activity relationships) with computational chemometrics. **Applied Artificial Intelligence: An International Journal**, v. 23, p. 261-281, 2009.

GOLBRAIKH, A. *et al.* Rational selection of training and test sets for the development of validated QSAR models. **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v. 17, n. 2-4, p. 241-53, 2003.

GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Predictive QSAR modeling based on diversity sampling of experimental datasets for the training and test set selection. **Molecular Diversity**, v. 5, n. 4, p. 231-43, jan. 2002.

GRAMATICA, P. Evaluation of different statistical approaches for the validation of quantitative structure–activity relationships. **ECVAM**, Ispra, p. 177, 2004.

HANSCH, C; LEO, A E HOEKMAN, D. **Exploring QSAR. Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants** ACS Professional Reference Book. American Chemical Society, Washington, DC 1995

- HARTUNG, T. *et al.* A modular approach to the ECVAM principles on test validity. **ATLA - Alternatives to Laboratories Animals**, v. 32, p. 467-472, 2004.
- HELMA, C. Lazar Carcinogenicity Predictions Lazy Structure-Activity Relationships (lazar) for the Prediction of Rodent Carcinogenicity and Salmonella. **Molecular Diversity**, v. 10, p. 147-158, 2006.
- HILLEBRECHT, A. *et al.* Comparative Evaluation of in Silico Systems for Ames Test Mutagenicity Prediction: Scope and Limitations. **Chemical Research in Toxicology**, p. 843-854, 2011.
- IBM SPSS STATISTICS FOR WINDOWS, Version 20.0. IBM Corp. Released 2012, Armonk, NY: IBM Corp.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, INMETRO. NT-DICLA-035-**Princípios de Boas Práticas de Laboratório**, 2002 Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Dicla/NIT/NIT-Dicla-35_02.pdf> Acesso em: 20 de janeiro de 2012
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA, INMETRO. DOQ-CGCRE-016.**Orientação para seleção e uso de materiais de referência** Rev 02 fev 2010 Disponível em<http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-16_02.pdf> Acesso em: 20 de janeiro de 2012.
- INTERNATIONAL CONFERENCE OF HARMONIZATION, ICH . **Guidance for Industry Q3A Impurities in New Drug Substances**. Revisão 2. ICH,2006. Disponível em <http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2__Guideline.pdf> .Acesso em: 28 de março de 2012.
- KAR, S.; ROY, K. First report on development of quantitative interspecies structure-carcinogenicity relationship models and exploring discriminatory features for rodent carcinogenicity of diverse organic chemicals using OECD guidelines. **Chemosphere**, v. 87, n. 4, p. 339-55, abr. 2012.
- KIM, K. H. Outliers in SAR and QSAR: 2. Is a flexible binding site a possible source of outliers? **Journal of Computer-aided Molecular Design**, v. 21, n. 8, p. 421-35, ago. 2007.
- KLINK, K. J.; MEADE, B. J. Dermal exposure to 3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole (AMT) induces sensitization and airway hyperreactivity in BALB/c mice. **Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 75, n. 1, p. 89-98, set. 2003.
- KRUHLAK, N.; CONTRERA, J. Progress in QSAR toxicity screening of pharmaceutical impurities and other FDA regulated products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 43-55, 2007.
- KRUHLAK, N. L. *et al.* (Q)SAR modeling and safety assessment in regulatory review. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v. 91, p 529-534, 2012.
- KUBINYI, H. **QSAR: Hansh analysis and related approaches.**, Weinheim, VCH, 1993.

- KUBINYI, H. **Quantitative Structure-Activity Relationship**, 13, 1995. p 285-294.
- KULKARNI, S. A.; ZHU, J.; BLECHINGER, S. In silico techniques for the study and prediction of xenobiotic metabolism: a review. **Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems**, v. 35, n. 10-11, p. 955-73, 2005.
- LAPENNA, S.; WORTH, A. **Analysis of the Cramer Classification Scheme for Oral Systemic Toxicity** - implications for its implementation in Toxtree. Italy [s.n.], 2011
- LEEUWEN, K. VAN *et al.* Using chemical categories to fill data gaps in hazard assessment. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 20, n. June, p. 207-220, 2009.
- LEK, S.; GUEGAN J.F. Artificial Neural Networks as a Tool in Ecological Modeling, an Introduction, **Ecological Modelling** v.120, p. 65-73, 1999.
- LEONARD, J. T.; ROY, K. On Selection of Training and Test Sets for the Development of Predictive QSAR models. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 25, n. 3, p. 235-251, mar. 2006.
- LILIENBLUM, W. *et al.* Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 4, p. 211-36, abr. 2008.
- MAGGIORA, G. M. On Outliers and Activity Cliffs Why QSAR Often Disappoints. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, n. 4, p. 1535, 2006.
- MARTIN, T. M. *et al.* Does rational selection of training and test sets improve the outcome of QSAR modeling? **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 10, p. 2570-8, 22 out. 2012.
- MILLETTI, F, *et al.* New and Original pKa Prediction Method Using Grid Molecular Interaction Fields **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2007, 47 (6), pp 2172-2181
- MILLETTI, F, *et al.* Tautomer Enumeration and Stability Prediction for Virtual Screening on Large Chemical Databases. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2009, 49 (1), pp 68-75
- MILLETTI, F e VULPETTI, A. Tautomer Preference in PDB Complexes and its Impact on Structure-Based Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, 2010, 50 (6), pp 1062-1074
- MOMBELLI, E.; DEVILLERS, J. Evaluation of the OECD (Q)SAR Application Toolbox and Toxtree for predicting and profiling the carcinogenic potential of chemicals. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 21, n. May, p. 731-752, 2010.
- MULTICASE*, disponível em <<http://www.multicase.com>> Acesso em: 21 de janeiro de 2012.
- NETZEVA, T. *et al.* Current status of methods for defining the applicability domain of (quantitative) structure-activity relationships. **ATLA -Alternatives to Laboratories Animals**, v. 2, p. 1-19, 2005.

NIEMI, G.J. Multivariate Analysis and QSAR: Application of Principal Components Analysis, In: W. Karcher and Devillers (eds.), **Practical Applications of Quantitative Structure-Activity Relationships (QSAR) in Environmental Chemistry and Toxicology**, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands, 1990, p. 153-169.

NIKOLOVA, N.; JAWORSKA, J. Approaches to Measure Chemical Similarity– a Review. **QSAR & Combinatorial Science**, v. 22, n. 910, p. 1006-1026, dez. 2003.

OASIS TIMES, disponível em <<http://oasis-lmc.org/?section=software&swid=4>> acesso em 21 de janeiro de 2013.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals and Related Documents** Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, 2008. Disponível em <http://www.oecd.org/document/40/0,3746,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html> Acesso em: 28 de março de 2012.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals and Related Documents**. Disponível em <<http://www.oecd.org/env/ehs/testing/oecdguidelinesforthetestingofchemicals.htm>> Acesso em: 19 de fevereiro de 2013.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, OECD. **Guidance Document on the Validation of (Quantitative) Structure-Activity Relationship [(Q)SAR] Models**. Series on Testing and Assessment No. 69, Paris, [s.n.], 2007 (a). 154 p

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, OECD. **Guidance on Grouping of Chemicals**, Series on testing and assessment number 80, Paris: [s.n.], 2007 (b). 99 p

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, OECD. **Guidance Document for Using the OECD (Q)SAR Application Toolbox to Develop Chemical Categories According to the OECD Guidance on Grouping of Chemicals**, Series on Testing and Assessment No. 102. Paris: [s.n.], 2009. 118 p

PATLEWICZ, G. *et al.* An evaluation of the implementation of the Cramer classification scheme in the Toxtree software. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 19, n. 5-6, p. 495-524, jan. 2008.

PAVAN, M.; WORTH, A. P. Publicly-accessible QSAR software tools developed by the Joint Research Centre. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 19, n. December, p. 785-799, 2008.

PIRES, J. R. **Relações Quantitativas entre Estrutura Química de Derivados Nitrofurânicos e a Atividade Microbiana contra *Caulobacter crescentus* e *Staphylococcus aureus***, 1998, Tese (Doutorado em Química Orgânica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998

PUBCHEM, **Base de dados**, <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>>, acesso em 17 de janeiro de 2013.

REUSCHENBACH, P.; SILVANI, M. ECOSAR model performance with a large test set of industrial chemicals. **Chemosphere**, v. 71, p. 1986-1995, 2008.

ROBERTS, D.; APTULA, A.; PATLEWICZ, G. applicability domains for non-animal based prediction of toxicological endpoints. QSAR analysis of the Schiff base applicability domain for skin sensitization. **Chemical Research in Toxicology**, v. 19, n. 9, p. 1228-1233, 2006.

ROGNAN, D. Chemogenomic approaches to rational drug design. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 1, p. 38-52, set. 2007.

RUSYN, I. *et al.* Predictive modeling of chemical hazard by integrating numerical descriptors of chemical structures and short-term toxicity assay data. **Toxicological Sciences : an Official Journal of the Society of Toxicology**, v. 127, n. 1, p. 1-9, maio. 2012.

SCHULTZ, T. W. *et al.* Assessing Applicability Domains of Toxicological QSARs: Definition, Confidence in Predicted Values, and the Role of Mechanisms of Action. **Health (San Francisco)**, n. 2, p. 238 - 254, 2007.

SCIOR, T. *et al.* How to recognize and workaroud pitfalls in QSAR studies: a critical review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 4297-4313, 2009.

SCOTTI, M.T. **Estudo de Propriedades Físico-químicas e de Critérios para Obtenção e Validação de Modelos QSAR para Séries de Análogos de Semicarbazonas com Atividade Antichagásica, Retiradas da Literatura**, 2005. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46135/tde-01032007-112133/>>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2013.

STANFORTH, R. A Measure of Domain of Applicability for QSAR Modelling Based on Intelligent K-Means Clustering. **QSAR & Combinatorial Science**, 2007.

TEBBY, C.; MOMBELLI, E.; PANDARD, P. Exploring an ecotoxicity database with the OECD (Q)SAR Toolbox and DRAGON descriptors in order to prioritise testing on algae, daphnids, and fis. **Science of Total Environment**, v. 409, p. 3334-3343, 2011.

TETKO, I. V. *et al.* Virtual computational chemistry laboratory - design and description, **Journal of Computer-aided Molecular Design**. v. 19, p. 453-63, 2005

TICHÝ, M. Experimental toxicology in silico. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Republic**, v. 149, n. 2, p. 217-219, 2005.

TODESCHINI, R.; CONSONNI, V. **Handbook of Molecular Descriptors**. Wiley, VCH, 2000.

TONG, W. *et al.* Workshop 1.2: Regulatory application of SAR/QSAR for priority setting of endocrine disruptors: A perspective. **Pure and Applied Chemical**, v. 75, n. 11-12, p. 2375-2388, 2003.

TOPKAT, disponível em <<http://accelrys.com/products/discovery-studio/admet.html>> acesso em 21 de janeiro de 2012.

TOPLISS, J.G.; COSTELLO R.J. Chance correlations in structure–activity studies using multiple regression analysis, **Journal Medicinal Chemistry**. v.15 p. 1066–1068, 1972.

TOPLISS, J.G.; EDWARDS, R.P. Chance factors in studies of quantitative structure–activity relationships, **Journal Medicinal Chemistry**. v.22 , p. 1238–1244, 1979.

TROPSHA, A. Best Practices for QSAR Model Development, Validation, and Exploitation. **Molecular Informatics**, v. 29, n. 6-7, p. 476-488, 2010.

USEPA. **Approaches for the Application of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Models and Supporting Data in Risk Assessment**. Washington: [s.n.], 2006. 123 p

WEED, D. L. Weight of evidence: a review of concept and methods. **Risk Analysis : an Official Publication of the Society for Risk Analysis**, v. 25, n. 6, p. 1545-57, 2005.

VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory, <http://www.vcclab.org>, 2005.

VRACKO, M. "Kohonen Artificial Neural Network and Counter Propagation Neural Network in Molecular Structure-Toxicity Studies", **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 1, p. 73-78, 2005.

WOLD, S., *et al.* The Collinearity Problem in Linear Regression, the Partial Least Squares (PLS) Approach to Generalized Inverses, **Journal of Science Statistics and Computer**, v. 5, p. 735-743, 1984.

WOLD, S.;JOHANSSON, E.; M. COCCHI. PLS: Partial Least Squares Projections to Latent Structures. In: Kubinyi,H. (ed.), **3D-QSAR In Drug Design: Theory, Methods and Applications**, Leiden, The Netherlands, ESCOM Science, 1993, p 523-550.

WORTH, A. *et al.* **A Framework for assessing in silico Toxicity Predictions : Case Studies with selected Pesticides**. Italy: [s.n.], 2011 a. 52 p.

WORTH, A. *et al.* **Applicability of QSAR Analysis in the Evaluation of Developmental and Neurotoxicity Effects for the Assessment of the Toxicological Relevance of Metabolites and Degradates of Pesticide Active Substances for Dietary Risk**. Italy: [s.n.], 2011 b. 174 p.

WORTH, A. *et al.* **The Use of Computational Methods in the Toxicological Assessment of Chemicals in Food : Current Status and Future Prospects**. Luxembourg: [s.n.], 2011 c. 143 p.

ZUPAN, J.; J. GASTEIGER . **Neural Networks for Chemistry and Drug Design**, Weinheim, Germany, Wiley-VCH, 1999.

ZVINAVASHE, E.; MURK, A. J.; RIETJENS, I. M. C. M. Promises and pitfalls of quantitative structure-activity relationship approaches for predicting metabolism and toxicity. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 12, p. 2229-36, dez. 2008.

APÊNDICES

Apêndice A – Proposta de revisão do Procedimento Operacional para análise de produto técnico equivalente com ênfase na avaliação da Fase II e relacionada a utilização da abordagem (Q)SAR e de outros Sistemas Especialistas

*Apendice B – Exemplo Prático 1: Exemplo da aplicação do procedimento proposto.
Utilização de abordagem (Q)SAR na avaliação de equivalência entre produtos técnicos*

Disponível no material impresso

Apêndice C - Relatório de Predição CAESAR para a impureza

Disponível no material impresso

Apêndice D - Relatório de Predição

Disponível no material impresso

Apêndice E - Relatório de Predição CAESAR para o composto análogo TIACLOPRIDO

Disponível no material impresso

Apêndice F - Relatório de Predição CAESAR para o TIAMETOXAM

Disponível no material impresso

Apêndice G - Relatório de Predição CAESAR para o ACETAMIPRIDO

Disponível no material impresso

Apêndice H - Relatório de Predição CAESAR para CLOTIANIDINA

Disponível no material impresso

Apendice I - Relatórios de Predição sumarizados para a impureza e os compostos análogos escolhidos relativo às predições obtidas no sistema LAZAR

Disponível no material impresso

Apêndice J – Exemplo Prático 2: Tentativas de construção de modelos QSAR

ANEXOS

Anexo I – Adaptação do formato de relatório proposto pela EC (QPRF – (Q)SAR Prediction Report Format) para apresentação de predições realizados por (Q)SAR ou outros sistemas especialistas para o propósito de avaliação de impurezas em produtos técnicos equivalentes

Anexo II – Relatório de validação (RV) de modelo (Q)SAR que deverá ser apresentado juntamente com RP

Disponível no material impresso

Anexo III – Cópia dos quadros gerados por Lazar Toxicity Predictions para predição de todos os endpoints disponíveis para predição no sistema LAZAR da impureza e dos compostos escolhidos como análogos

*Anexo IV- Cópia do Procedimento de Avaliação de Processos de Registro de Produtos
Técnicos por Equivalência*


Disponível no material impresso

POP – Procedimento operacional padrão para
Avaliação de Processos de Registro de
Produtos Técnicos por Equivalência

Histórico de Revisão		Avaliação por Equivalência	
Versão	Natureza da Alteração	Elaborador	Aprovação
1.0	Emissão Inicial	MAPA ANVISA IBAMA	CTA 20.09.2011

Sumário

1. OBJETIVO	3
2. APLICAÇÃO	3
2.1. Área Técnica dos órgãos de agricultura, saúde e meio ambiente.....	3
2.2. Grupo de Coordenação de Equivalência (GCE).....	3
2.3. Comitê Técnico de Assessoramento em Agrotóxico (CTA).....	3
3. RESPONSABILIDADES	3
3.1. Área técnica dos três órgãos:.....	3
3.2. Área Técnica da Saúde	3
3.3. Área Técnica do Meio Ambiente	3
3.4. Área técnica da Saúde e do Meio Ambiente	3
3.5. Grupo de Coordenação de Equivalência - GCE:	3
3.6. CTA:	3
4. TERMOS, DEFINIÇÕES E SIGLAS.....	4
4.1. Termos e definições.....	4
4.2. Siglas	5
5. DESCRIÇÃO DAS ETAPAS DE AVALIAÇÃO.....	5
5.1. Check-list.....	5
5.2. Análise da Fase I.....	7
5.2.1. Estudos Físico-Químicos.....	7
5.2.2. Descrição do Processo de Produção.....	7
5.2.3. Estudo de 5 Bateladas.....	8
5.2.4. Declaração Quali-Quantitativa	11
5.2.5. Equivalência do Perfil de Impureza (Anexo X, Item 3.1 – Decreto N° 4074/02)	12
5.3. Análise da Fase II	12
5.3.1. Critérios para Solicitação dos Estudos Toxicológicos e Avaliação	13
5.3.2. Equivalência do Perfil Toxicológico (Anexo X, Item 4 – Decreto N° 4074/02).....	15
5.4. Fase III – Relativa a saúde.....	16
5.5. Fase III – Relativa ao meio ambiente	17
6. REGISTROS DOCUMENTAIS.....	17
7. LEGISLAÇÃO DE REFERÊNCIA	17
8. ANEXOS	18


/ 27
ce

1. OBJETIVO

Padronizar os procedimentos de avaliação dos processos de registro de produtos técnicos por equivalência.

2. APLICAÇÃO

2.1. Área Técnica dos órgãos de agricultura, saúde e meio ambiente

2.2. Grupo de Coordenação de Equivalência (GCE)

2.3. Comitê Técnico de Assessoramento em Agrotóxico (CTA)

3. RESPONSABILIDADES

3.1. Área técnica dos três órgãos:

– Realizar avaliação da Fase I, seguindo os procedimentos e modelos de Nota Técnica e modelo de Parecer deste POP.

– Comunicar situações não previstas neste procedimento ao seu coordenador imediato.

– Participar de reuniões conjuntas dos 3 órgãos quando necessário e demandado pelas coordenações ou para revisar o procedimento.

3.2. Área Técnica da Saúde

– Realizar a avaliação da Fase II seguindo os procedimentos descritos neste POP.

3.3. Área Técnica do Meio Ambiente

– Realizar o *Check list* documental.

3.4. Área técnica da Saúde e do Meio Ambiente

– Realizar a avaliação da Fase III resguardadas suas respectivas competências.

3.5. Grupo de Coordenação de Equivalência - GCE:

– Distribuir os processos conjuntamente para avaliação.

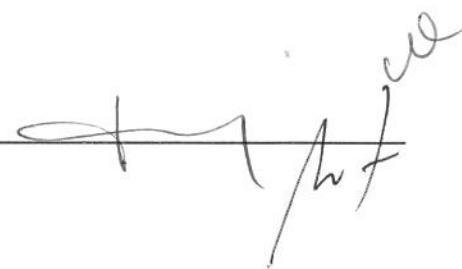
– Acompanhar a avaliação dos processos em seus respectivos órgãos.

– Convocar reunião para discutir novos procedimentos ou revisar este POP.

– Padronizar procedimentos para situações não previstas neste POP.

3.6. CTA:

– Aprovar este procedimento e futuras revisões, bem como a forma de comunicação destes procedimentos.



4. TERMOS, DEFINIÇÕES E SIGLAS

Os termos e definições abaixo são uma complementação às informações presentes no Decreto nº 4.074 de 2002.

4.1. Termos e definições

Equivalência: é a determinação da similaridade dos perfis de impurezas e toxicológico, entre o produto técnico candidato a equivalente e o produto técnico de referência, a fim de avaliar se os mesmos apresentam níveis semelhantes de perigo.

Produto Técnico Candidato a Equivalente: produto técnico a ser avaliado considerando os critérios de equivalência estabelecidos no Decreto nº 4074/02.

Produto Técnico de Referência: produto técnico que possui todos os estudos, testes, dados e informações necessários à avaliação, podendo ser considerado referência mesmo se seu registro estiver cancelado.

Impureza: qualquer substância, que não o ingrediente ativo, que está presente no produto técnico originado da matéria-prima, do processo de produção ou da degradação durante a estocagem.

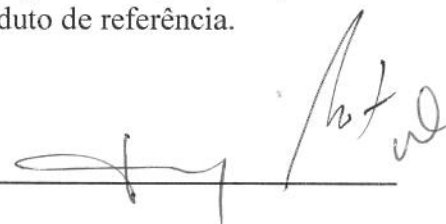
Impurezas significantes: impurezas que ocorrem ou potencialmente ocorrem devido à variabilidade do processo em quantidades maiores ou iguais à 1g/kg no produto técnico.

Impurezas relevantes: Impurezas de um produto técnico originadas da matéria-prima, do processo de produção ou da degradação durante estocagem que, quando comparadas ao ingrediente ativo, são toxicologicamente significantes à saúde ou ao meio ambiente, afetam a estabilidade do produto técnico ou causam outro efeito adverso. São consideradas toxicologicamente relevantes:

- I. Qualquer impureza identificada em bancos de dados toxicológicos que exibam efeitos teratogênicos, carcinogênicos, mutagênicos ou de alterações hormonais e danos ao aparelho reprodutor;
- II. Qualquer impureza estruturalmente similar às substâncias ou grupos químicos listados no Anexo II da INC nº02/08; ou
- III. Qualquer impureza que atue como um ingrediente ativo.

Impurezas novas: impurezas que ocorrem ou potencialmente ocorrem devido à variabilidade do processo, em quantidades declaradas maiores ou iguais a 1g/kg no produto técnico candidato a equivalente e que não foram declaradas no produto de referência.

Impurezas incrementadas: impurezas que ocorrem ou potencialmente ocorrem devido à variabilidade do processo em quantidades declaradas maiores que 3 g/kg ou 50 %, o que representar o maior nível de incremento, quando comparadas à declaração do produto de referência.



4.2. Siglas

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas.
AOAC – Association of Official Analytical Chemists
BPL – Boas Práticas de Laboratório
CAS – Chemical Abstract Service
CIPAC – Collaborative Internacional Pesticidas Analytical Council
DAD – Detector de Arranjo de Diodos, do inglês Diode Array Detector
DL50 – Dose letal em 50% dos animais
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês High Performance Liquid Chromatography
INC – Instrução Normativa Conjunta
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LC – Cromatografia Líquida, do inglês Liquid Chromatography
MS – Espectometria de Massas, do inglês Mass Spectrography
OECD – Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico, do inglês Organization for Economic and Cooperation and Development
PIOR – Produto Impeditivo de Obtenção de Registro
PTE – Produto Técnico Equivalente
PTR – Produto Técnico de Referência
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
SANCO – Direção Geral da Saúde e Consumidores da Comissão Européia, do francês Santé et Consommateurs
UV – Ultravioleta

5. DESCRIÇÃO DAS ETAPAS DE AVALIAÇÃO

Ofício ou notificação de exigência, em qualquer uma das fases da avaliação ou do check list, deverá ser encaminhado para a empresa com cópia aos demais órgãos contendo frase para que a resposta seja protocolada nos 3 órgãos.

5.1. Check-list

O processo de registro de produtos técnicos equivalentes deve passar previamente por um *check list*, onde serão conferidos os documentos obrigatórios exigidos no Decreto nº 4074/2002.

Nesse procedimento de *check list* devem ser verificados os seguintes itens:

- a) Requerimento: se todos os campos do requerimento foram preenchidos ou foi apresentada justificativa procedente, com a observação se estão de acordo com os anexos do item 11;

b) Anexos do item 11.

b.1) Item 11.2 – se o comprovante de registro está em conformidade com a(s) finalidade(s) assinalada(s) no item “5. Finalidade” do requerimento, e dentro do prazo de validade.

b.2) item 11.3 - se o comprovante de registro estadual, do Distrito Federal ou do Município do(s) fabricante(s), contempla a autorização da empresa na atividade de fabricação de produtos agrotóxicos e afins.

b.3) item 11.5 – se procuração da empresa requerente ao(s) representante(s) legal(is), está devidamente atualizada.

b.4) item 11.6 – se o Certificado de Análise Física do produto contem, no mínimo, identificação do nome e lote da amostra do produto, e análise do teor de ingrediente ativo, bem como se foi emitido por instalações de teste reconhecidas e monitoradas de acordo com os princípios de Boas Práticas de Laboratório para as áreas de especialidades dos estudos apresentados.

b.5) item 11.7 – se para as informações apresentadas foram **citadas** as fontes onde a situação de registro, os usos autorizados e as possíveis restrições ao produto foram consultados

b.6) item 11.8 - se para as informações apresentadas foram **citadas** as fontes onde foram consultadas a existência de restrições ou proibições a produtos à base do mesmo ingrediente ativo de seu produto, e em caso positivo, a razão das mesmas, em outros países.

b.7) item 11.9 – se foi apresentada a descrição do método de desativação do produto acompanhado do respectivo documento comprobatório que deve ser um laudo técnico, emitido pela empresa ou entidade competente para esse fim, onde conste a identificação do produto ao qual se refere; indicando o poder de redução dos componentes, identificando os resíduos remanescentes e a(s) entidade(s) instalada(s) no País apta(s) a realização do processo, devidamente datada e assinado pelo responsável técnico.

c) Item 15.1 – verificar se o produto técnico de referência esta na lista disponibilizada pela ANVISA ou se foi apresentada cópia de resposta da ANVISA se o produto indicado pode ser referência. Na ausência desses dois a ANVISA deverá ser consultada.

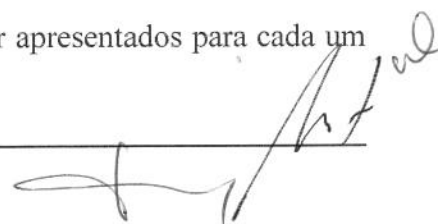
d) itens 16.1 a 16.6 do Anexo II do Decreto nº 4074/2002:

d.1) no item 16.5 deve ser verificado se a descrição do processo de produção do produto técnico, contemplando suas etapas de síntese, seus subprodutos e impurezas, foi fornecida pelo fabricante. Quando o fabricante for estrangeiro, o documento deve possuir a legalização pela autoridade consular brasileira, em sua jurisdição consular. A tradução deverá ser feita obrigatoriamente no Brasil, por tradutor público juramentado. Não deverão ser aceitas outras descrições que não sejam feitas pelo próprio fabricante.

d.2) Se consta a informação sobre a origem das amostras utilizadas nos estudos físico-químicos e no estudo de cinco bateladas.

d.3) Se os estudos citados no item d.2) foram conduzidos em instalações de teste reconhecidas e monitoradas de acordo com os princípios de BPL conforme exigências das normas brasileiras vigentes.

d.4) para o item 16.6 os estudos físico quimicos devem ser apresentados para cada um dos fabricantes.



Quando os documentos relacionados no itens *a)* a *d.1)* estiverem incompletos e/ou em desacordo com o Decreto deverão ser exigidos da empresa requerente as devidas adequações, dentro do prazo de 30 dias. Caso a empresa não cumpra a exigência nesse prazo, a solicitação de registro deverá ser indeferida.

Caso a informação do item *d.2)* não conste nos estudos ou em outro documento, expedido pelo fabricante do produto, deverá ser exigido da empresa requerente uma declaração do fabricante para ratificação da origem das amostras, dentro do prazo de 30 dias. Caso a empresa não cumpra a solicitação nesse prazo, os estudos deverão ser recusados e a solicitação de registro deverá ser indeferida.

Caso, pela verificação do item *d.3)*, fique comprovado que os estudos foram realizados em instalações de teste não reconhecidas e monitoradas de acordo com os princípios de BPL, os mesmos deverão ser recusados e a solicitação de registro deverá ser indeferida.

Se não houver pendências nos documentos e informações citadas nos itens *acima* o processo estará apto para ser avaliado.

5.2. Análise da Fase I

5.2.1. Estudos Físico-Químicos

Os seguintes estudos de propriedades físico-químicas devem ser avaliados:

- Pressão Vapor;
- Coefficiente de partição 1-octanol/água;
- Solubilidade em água;
- Ponto de fusão/ebulição; e
- Adicionalmente informações sobre aspecto/cor/odor do produto, que podem estar contidos no relatório ou que estão contemplados no certificado de análise físico-química.

Deve-se verificar se os estudos físico-químicos atendem aos princípios de BPL, contendo a origem inequívoca da amostra e as referências quanto às metodologias analíticas utilizadas.

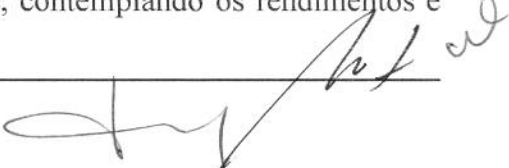
Os estudos físico-químicos devem seguir protocolos reconhecidos internacionalmente. Observar, ainda, se os parâmetros de validação estipulados nos protocolos foram seguidos e atendem aos critérios especificados.

Estes estudos são para caracterizar o produto e podem ser um indicativo para as diferenças do perfil qualitativo e quantitativo e devem ser apresentados para cada um dos fabricantes constantes no pleito

5.2.2. Descrição do Processo de Produção

A descrição do processo de produção do produto técnico deve contemplar suas etapas de síntese, seus subprodutos e impurezas, fornecida pelo(s) fabricante(s), contendo:

- Fluxograma e as reações químicas de cada etapa do processo;
- Identidade dos reagentes, solventes e catalisadores, com suas respectivas purezas;
- Descrição detalhada das etapas do processo de síntese, contemplando os rendimentos e condições de temperatura e pressão de cada etapa;



- d) Descrição das etapas de purificação (incluindo as usadas para recuperar ou reciclar materiais de partida, intermediários ou substâncias geradas);
- e) Discussão sobre a formação teórica de todas as possíveis impurezas.

Deve ser verificado se as informações fornecidas pelo(s) fabricante(s) são suficientes para a compreensão da síntese do produto e de todas as possíveis impurezas geradas no processo. Caso contrário, informações complementares devem ser solicitadas, concedendo um prazo de 30 dias para o atendimento.

Caso haja necessidade de substituição do documento encaminhado inicialmente, poderá ser aceito cópia do documento original em inglês até a entrega do definitivo consularizado. Nos casos em que não for necessária a substituição, não deverá ser exigido a consularização de esclarecimentos adicionais.

Os processos de síntese do produto candidato a equivalente e do produto de referência devem ser analisados em relação às etapas de síntese, reagentes, solventes, catalisadores e pontos críticos (ex. temperatura e pressão). Deve ser comparada principalmente a rota de síntese, se tiver sido utilizada a mesma rota comparar os demais parâmetros, conforme modelo de Nota Técnica.

Verificar se a discussão de formação das impurezas foi elaborada e fornecida por cada fabricante, considerando as informações sobre os materiais de partida e as rotas de síntese. Deve-se ainda verificar as informações sobre espécies intermediárias, isômeros, impurezas de materiais de partida, bem como quaisquer outras impurezas possíveis de ocorrerem em níveis $\geq 0,1\%$ foram descritas.

Caso o estudo de 5 bateladas identifique impurezas em níveis $\geq 0,1\%$ não apresentadas na discussão teórica sobre a formação de impurezas, deverá ser solicitada emenda a discussão originalmente apresentada que justifique a presença dessas impurezas adicionais.

O ofício ou notificação de exigência deverá ser encaminhado para a empresa com cópia aos demais órgãos contendo frase para que a resposta seja protocolada nos 3 órgãos.

5.2.3. Estudo de 5 Bateladas

No estudo de cinco bateladas deve ser observado:

- a) Identificação da unidade de fabricação do produto

Caso o relatório contenha apenas o patrocinador, deverá ser verificado se a empresa registrante encaminhou declaração do fabricante dos lotes utilizados no estudo atestando a origem dos mesmos.

- b) Identificação inequívoca e quantificação do ingrediente ativo e de todas as impurezas maiores que $0,1\%$ (m/m)

Deve ser observado se o estudo de cinco bateladas foi orientado pela discussão teórica sobre a formação de impurezas, emitida pelo fabricante. Caso existam impurezas apresentadas na discussão, mas não pesquisadas no estudo, deve-se verificar se o estudo comprova que essas impurezas realmente estejam em níveis $< 0,1\%$. Se não houver essa comprovação, deve ser

solicitada justificativa técnica ou complementação ao estudo, desde que as amostras encontrem-se dentro do prazo de validade.

Verificar se no estudo foram empregados os respectivos padrões analíticos para cada impureza a ser pesquisada, as técnicas necessárias e se a quantificação de impureza foi realizada com metodologia analítica validada.

Excepcionalmente, na ausência dos padrões analíticos de cada impureza, o estudo poderá empregar a técnica de padrões análogos. Neste caso, as impurezas devem ser isoladas ou sintetizadas pelo fabricante ou laboratório em quantidades suficientes para permitir a identificação inequívoca da substância. Para a quantificação das impurezas, utilizando tal técnica, deve ser verificado se o fator de correção foi considerado como sendo a razão entre a resposta do padrão da impureza e a resposta do padrão da substância determinado como análogo.

Para a determinação do fator de correção, devem ser utilizadas no mínimo 3 concentrações diferentes da impureza/padrão análogo com determinações da área em duplicata. O coeficiente de absorção devida ser obtido pelo coeficiente angular da reta obtida.

c) Varredura analítica (screening) do produto técnico

Quando o screening for utilizado como única justificativa para comprovação de que possíveis impurezas presentes estejam em níveis $< 0,1\%$ deve-se verificar:

c.1) Caso seja utilizado HPLC/DAD ou HPLC/UV, a escala utilizada deve permitir a avaliação quanto à existência de impurezas e apresentar as proporções de área que comprovem ou não a existência das mesmas. No caso do uso do detector DAD, ainda devem ser apresentados espectros com as leituras em outros comprimentos de onda e a avaliação da pureza do pico, que assegurem a utilização do comprimento de onda adequado.

c.2) Quando a técnica de LC/MS for utilizada, um perfil de impurezas no UV deve ter sido anteriormente estudado. A utilização do LC/MS é recomendada quando uma impureza pode co-eluir com o ingrediente ativo ou com outra impureza, no caso de duas substâncias com espectro de UV semelhantes.

c.3) Na análise, deve ser observada a existência de picos não integrados, não identificados ou não quantificados com teores $\geq 0,1\%$.

c.4) Caso a varredura não tenha sido suficiente para a avaliação, informações complementares podem ser solicitadas e o prazo concedido deve ser de 30 dias.

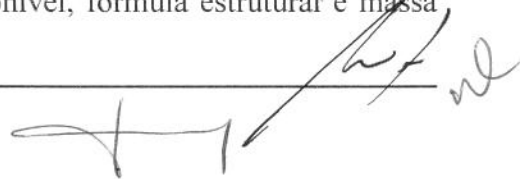
d) Identificação e quantificação das impurezas toxicológica e ambientalmente relevantes

As impurezas toxicológica e ambientalmente relevantes constantes da INC nº 02/08, devem obrigatoriamente ser identificadas e quantificadas no estudo de 5 bateladas.

Os métodos utilizados devem apresentar limites de quantificação e detecção menores ou iguais aos limites máximos aceitáveis especificados na INC nº 02/08.

Quando os valores de concentração das impurezas relevantes ultrapassarem os limites estabelecidos na INC nº 02/08, o pleito será considerado impeditivo de obtenção de registro.

e) Identificação por meio do número CAS, quando disponível, fórmula estrutural e massa molecular de cada impureza identificada;



f) Resultados e médias das cinco bateladas

Deve-se observar se o fechamento analítico de cada lote é igual ou maior que 98% (m/m). Além disso, deve-se observar se o estudo apresenta dados analíticos suficientes que garantam a pesquisa de todas as impurezas possíveis de ocorrerem em níveis $\geq 0,1\%$.

Quando o ingrediente ativo ou impurezas tiverem em sua composição compostos inorgânicos como, por exemplo, S, P, Zn, Sn, Mn, Fe, Cl, Na, ou quando as impurezas forem quantificadas por grupo, por exemplo, fenóis livres, aminas livres ou cinzas, deve-se avaliar se o teor desses não foi considerado mais de uma vez para o fechamento analítico.

Quando forem apresentados resultados analíticos como: insolúveis em acetona, em NaOH, cinzas ou outros não específicos, estes não devem ser considerados para o fechamento analítico a não ser que haja justificativa técnica fundamentada pelo laboratório.

g) Descrição detalhada dos métodos analíticos empregados;

Deve-se identificar quais técnicas analíticas foram empregadas para a identificação e a quantificação do ingrediente ativo e de cada uma das amostras. O relatório deve conter, além da descrição do procedimento utilizado na identificação, um cromatograma representativo de cada batelada incluindo as áreas dos picos e tempos de retenção e um espectro de massa, UV, RMN, ou outros, dependendo da metodologia utilizada para identificação.

Na quantificação, o relatório deve conter os cromatogramas representativos de cada batelada, do branco, dos padrões e daqueles utilizados para a construção da curva de calibração.

Os relatórios devem ser acompanhados de discussão detalhada dos resultados e memórias de cálculo de cada etapa, informando os valores dos fatores de diluição e outros dados necessários para o cálculo.

h) Cópias dos certificados dos padrões analíticos (do ingrediente ativo e de cada impureza) e dos lotes utilizados no estudo de cinco bateladas.

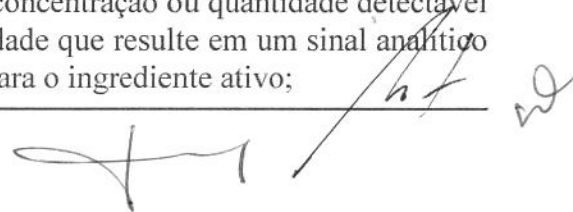
Devem ser observadas as datas de fabricação e validade dos padrões analíticos, a origem dos mesmos e se foram utilizados para a identificação e quantificação das mesmas substâncias.

Para os padrões analíticos produzidos no próprio laboratório deve ser verificado se houve a identificação inequívoca da substância.

i) Relatórios de validação dos métodos analíticos

Deve-se verificar se apresentam, no mínimo, os seguintes parâmetros de validação para os métodos analíticos utilizados para a quantificação de ingrediente ativo e impurezas:

- I – Especificidade/Seletividade, realizado com branco de reagentes, material de referência e amostra;
- II – Linearidade; quando o coeficiente de correlação linear for $< 0,99$, uma justificativa deve ser apresentada. A faixa de linearidade deve abranger a concentração da impureza.
- III – Limite de detecção, calculado como a menor concentração ou quantidade detectável no método escolhido, geralmente uma quantidade que resulte em um sinal analítico três vezes o sinal do ruído. Não é necessário para o ingrediente ativo;



- IV – Limite de quantificação, apresentado com a menor concentração ou quantidade de um analito em uma amostra que pode ser quantitativamente determinada com nível de precisão e exatidão aceitável, geralmente uma concentração próxima ao limite inferior da faixa linear de trabalho. Esse dado não é necessário para o ingrediente ativo;
- V – Exatidão, contendo todos dados obtidos para cada nível de concentração utilizado;
- VI – Precisão, contendo todos dados obtidos, assim como coeficiente de variação calculado em cada teste.

O relatório de validação deve apresentar os resultados de desempenho do método analítico e atender ao protocolo utilizado, por exemplo, Sanco 3030/99 Rev.4, Inmetro DOQ-CGCRE-008 ou ABNT NBR 14029:2005. Deverão ser recusados os estudos que não apresentarem critérios de validação de acordo com o protocolo utilizado e os respectivos pleitos de registro deverão ser indeferidos.

A utilização de métodos reconhecidos (exemplo CIPAC, AOAC) não exige a apresentação de critérios mínimos de validação. No caso de métodos reconhecidos, deverão ser apresentados a descrição da metodologia analítica, os dados de desempenho desses métodos e os dados de verificação (exatidão/precisão) no laboratório executor. Caso sejam feitas adaptações no método reconhecido, deverá ser verificada a necessidade de validação completa.

Caso algum critério não atenda o especificado, deve ser solicitada justificativa técnica. Nos casos em que o adendo ao estudo de cinco bateladas seja insuficiente para o esclarecimento das exigências realizadas, o estudo será recusado e o pleito de registro será indeferido.

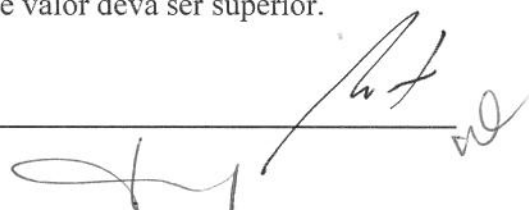
As metodologias utilizadas para o produto candidato à equivalente e para o produto de referência podem ser comparadas, com o objetivo de esclarecer as eventuais diferenças de resultados analíticos dos produtos técnicos em questão.

5.2.4. Declaração Quali-Quantitativa

A declaração qualitativa e quantitativa deve conter nome químico, número CAS (quando disponível), limite mínimo de ingrediente ativo e máximo das impurezas e assinatura do representante legal da empresa registrante.

A declaração do registrante sobre a composição qualitativa e quantitativa deve indicar os limites do ingrediente ativo e das impurezas baseados na análise de cinco bateladas. A declaração é única para cada produto técnico, ou seja, esses limites devem atender às composições quali-quantitativas de todos os fabricantes que constam no produto técnico em questão. Deve-se observar que:

- a) Os limites máximos devem ser estabelecidos para impurezas presentes em níveis iguais ou acima de 1g/kg e as toxicologicamente relevantes em quaisquer níveis;
- b) Os limites máximos das impurezas devem ser obtidos por meio de uma análise estatística, por exemplo, a média dos resultados das cinco bateladas mais três vezes o desvio padrão calculado. Caso o valor declarado seja superior a esse cálculo, o requerente deve explicar a análise estatística utilizada ou o motivo pelo qual esse valor deva ser superior.



- c) No caso de mais de um fabricante, cada impureza deve ser declarada de acordo com o estudo de cinco bateladas no qual a impureza aparece em maior concentração. Não deve ser utilizado o valor do desvio padrão dos lotes de todos os estudos
- d) A somatória dos valores declarados para os teores de ingrediente ativo e impurezas deve ser $\geq 98\%$.

Os limites máximos das impurezas com relevância toxicológica e ecotoxicológica deverão obedecer a especificações da INC n°. 02/2008, podendo ser declarados até o limite máximo da INC independente do quantificado nas cinco bateladas. Caso seja declarado valor superior ao estipulado o produto será considerado produto impeditivo de obtenção de registro.

Poderão ser solicitados dados de controle de qualidade quando a declaração do registrante e o estudo de cinco bateladas apresentarem dados divergentes. Se o controle de qualidade demonstrar claramente que o estudo de cinco bateladas não é representativo do produto pleito de registro, ele será indeferido.

5.2.5. Equivalência do Perfil de Impureza (Anexo X, Item 3.1 – Decreto N° 4074/02)

A comparação do perfil de impurezas do produto candidato à equivalente com relação ao produto de referência deve ser feita, considerando os teores de impurezas da primeira declaração considerada aceitável do produto de referência. Deve sempre ser observado o perfil do referênci na época em que o mesmo foi registrado, principalmente na ausência de declaração ajustada.

Em relação à comparação química da composição do produto de referência com o produto candidato à equivalente, este será considerado equivalente na fase I se:

- a) Os limites máximos declarados de cada impureza não relevante não excederem mais que 3g/kg ou 50% em relação à declaração do produto de referência, o que significar o maior incremento;
- b) Não houver impurezas novas em concentrações máximas declaradas maiores ou iguais a 1g/kg no produto;
- c) Houver impurezas relevantes em concentrações máximas declaradas iguais ou abaixo do valor estipulado a INC n°. 02/08.

5.3. Análise da Fase II

Quando existir uma impureza nova ou impureza incrementada acima dos limites citados no item 5.2.5, o processo de avaliação passará à Fase II. Os estudos toxicológicos requeridos deverão ser conduzidos com lotes utilizados no estudo de cinco bateladas, cujo(s) teor(es) da(s) impureza(s) nova(s) ou incrementada(s) deverão preferencialmente estar no maior nível. Caso os estudos sejam conduzidos com lote diferente daqueles utilizados no estudo de cinco bateladas, deverá ser apresentada a quantificação do teor de ingrediente ativo e da(s) impureza(s) nova(s) ou incrementada(s) e os teores deverão estar próximos aos valores máximos encontrados no estudo de cinco bateladas.

Caso seja necessária a condução de estudos toxicológicos com um dos lotes do estudo de cinco bateladas e o mesmo estiver fora do prazo de validade, os cinco lotes deverão ser reanalisados

a fim de comprovar a manutenção da integridade das amostras. A reanálise deverá ser feita nas mesmas condições utilizadas no estudo de cinco bateladas.

O analista deverá indicar, considerando os resultados da reanálise, um lote para uso nos estudos toxicológicos. O lote reanalisado estará apto para ser utilizado nos estudos toxicológicos quando a concentração da(s) impureza(s) de interesse estiver igual ou maior que o nível que levou o processo à Fase II, desde que esteja abaixo ou igual ao respectivo limite máximo declarado. Caso a concentração da impureza em todos os lotes reanalisados tenha diminuído a ponto de não ser mais necessária a Fase II, estes lotes não poderão ser utilizados nos estudos toxicológicos solicitados. Desta forma, deverá ser solicitada condução de estudos toxicológicos com nova amostra, com perfil adequado para a avaliação.

5.3.1. Critérios para Solicitação dos Estudos Toxicológicos e Avaliação

Devem ser considerados os critérios abaixo para a solicitação de estudos:

1. Em qualquer nível de impureza nova ou incrementada, estudo de relação estrutura atividade (REA);
2. Quando a impureza estiver declarada nos níveis de ≥ 0.1 a $< 1\%$, o Teste de Ames com o produto técnico ou com a impureza, a não ser que haja boas indicações de que outro tipo de teste de genotoxicidade possa ser mais apropriado, por exemplo, quando houver evidência de REA para um efeito no fuso mitótico, onde o teste de micronúcleo é o mais indicado;
3. Quando a impureza estiver declarada em níveis $\geq 1\%$ na declaração do produto técnico equivalente:
 - 3.1. Teste de Ames;
 - 3.2. Teste de micronúcleo;
 - 3.3. Teste de sensibilização dérmica;
 - 3.4. Toxicidade oral aguda; sempre que não houver dados agudos disponíveis para a impureza ou quando o cálculo de incremento de perigo do ingrediente ativo for maior que 10%.

Quando a impureza nova ou incrementada for uma substância usada como matéria-prima, intermediário, solvente ou aditivo poderá ser solicitada a Ficha de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ), quando não disponível na internet, com o objetivo de verificar se existem dados toxicológicos confiáveis para esse tipo de impureza.

Para diminuir o erro da estimativa os dados de perigo da impureza devem ser referenciados. Devem ser utilizados dados oriundos de referências conhecidas, de preferência de bases de dados toxicológicas, onde dados do estudo podem ser obtidos, como protocolo, espécie, laboratório, data etc.

Quando as referências bibliográficas forem suficientes, deve-se avaliar a relevância da impureza considerando os seguintes critérios:

- (i) se a natureza da toxicidade da impureza for considerada similar a do ingrediente ativo, ou seja, existirem dados de perigo comparáveis do ingrediente ativo e da impureza, por exemplo, dados de DL50 oral não podem ser comparados com DL50 dérmica;

- (ii) se os efeitos tóxicos da impureza podem ser considerados aditivos, por exemplo, pode haver diminuição da DL50 oral do produto devido a presença da impureza, e
- (iii) que a toxicidade da impureza esteja determinada ou seja possível estimá-la a partir de dados de estrutura atividade.

Os cálculos são apresentados na íntegra, para maior clareza, mas pode ser simplificado omitindo o prazo para o risco relativo do ingrediente ativo (= 1).

Cálculo

- (i) Cálculo do perigo relativo da impureza (RelHazimp) com base no dado de perigo da impureza (Hazimp) e do ingrediente ativo (Hazai).

$$\text{RelHazimp} = (\text{Hazai}/\text{Hazimp})$$

O perigo relativo do ingrediente ativo (RelHazai) é 1.

- (ii) Cálculo do aumento teórico máximo de perigo da mistura de ingrediente ativo/impureza (MTIHaz), como uma proporção do perigo ingrediente ativo (Hazai), do mínimo de pureza do produto técnico (%aimin) e o conteúdo máximo teórico da impureza (%impmax).

$$\text{MTIHaz} = ((\%aimin \times \text{RelHazai}) + (\%impmax \times \text{RelHazimp})) / (\%aimin \times \text{RelHazai})$$

- (iii) Cálculo do nível máximo aceitável da concentração da impureza (%Impmaxaccept) pela substituição do limite de 1.1 (i.e. +10%) para o MTIHaz e %Impmaxaccept da %impmax, na equação (ii):

$$1.1 = ((\%aimin \times \text{RelHazai}) + (\%Impmaxaccept \times \text{RelHazimp})) / (\%aimin \times \text{RelHazai})$$

É rearranjando a equação (iii):

$$\%Impmaxaccept = ((1.1 \times \%aimin \times \text{RelHazai}) - (\%aimin \times \text{RelHazai})) / \text{RelHazimp}$$

Onde

Hazai = valor de perigo do ingrediente ativo;

Hazimp = valor de perigo da impureza;

RelHazimp = razão entre o perigo da impureza e o perigo do ingrediente ativo

RelHazai = razão de perigo do ingrediente ativo(=1);

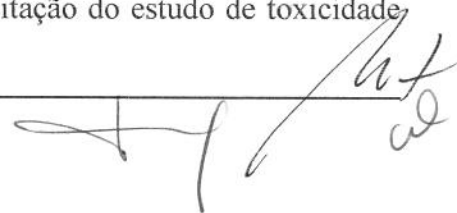
%aimin = limite mínimo de ingrediente ativo;

%impmax = limite máximo teórico da impureza;

MTIHaz = aumento máximo teórico do perigo devido a impureza;

%impmaxaccept = máximo aceitável do teor de impureza.

Se os cálculos acima apresentarem resultados para o MTIHaz menor que 10% a impureza é não relevante e deve-se considerar sobre a real necessidade de solicitação do estudo de toxicidade aguda.



Os estudos toxicológicos devem ser conduzidos com produto cuja composição qualitativa e quantitativa esteja determinada e com níveis de impurezas próximos aos declarados.

Os testes de mutagênese gênica e cromossômica e sensibilização dérmica devem estar de acordo com as orientações do Ofício ANVISA nº 02/2009.

Deve ser ressaltado em exigência que o estudo de sensibilização dérmica deve ser preferencialmente conduzido com o protocolo OECD nº 429 (Local Lymph Node Assay-LLNA).

Estudos de REA deverão apresentar todos os endpoints possíveis de serem avaliados in silico no programa escolhido para a impureza e para o ingrediente ativo. Deve-se avaliar a confiabilidade do dado gerado pelo programa e o suporte científico.

Quando os alertas encontrados forem diferentes daqueles do ingrediente ativo, a avaliação do REA deve levar em consideração os seguintes critérios:

1. Quando houver alerta para endpoint agudo, deverá ser solicitado o estudo referente ao alerta gerado; no entanto, quando se tratar de endpoints de irritação dérmica e ocular, esses estudos não devem ser solicitados;
2. Quando houver alerta de mutagenicidade gênica ou cromossômica, deve se verificar se o estudo entregue é suficiente para elucidar esse alerta;
3. Para os casos onde o limite máximo da impureza for inferior a 1% e houver alerta de mutagenicidade cromossômica, o estudo referido deverá ser solicitado para elucidar o alerta gerado.

Dependendo dos alertas apontados pelo programa de REA, poderão ser solicitados estudos toxicológicos da Fase III.

5.3.2. Equivalência do Perfil Toxicológico (Anexo X, Item 4 – Decreto Nº 4074/02)

Os produtos serão considerados equivalentes na Fase II quando:

1. As impurezas novas e/ou incrementadas não apresentarem alertas (REA) diferentes dos obtidos para o ingrediente ativo relacionados a endpoints que somente poderão ser investigados com estudos da Fase III.
2. Os estudos de mutagênese e sensibilização dérmica apresentarem resultados negativos. Resultados positivos dos estudos de mutagênese e sensibilização dérmica poderão ocorrer quando o produto de referência possuir esse mesmo resultado, sendo comparado por teste.
3. O resultado obtido no teste de toxicidade oral aguda não ultrapassar o fator 2 com relação ao resultado do produto de referência.

Para a comparação dos resultados dos estudos onde o fator 2 é utilizado, deve-se atentar para as doses utilizadas nos estudos e as diferenças entre os protocolos. Quando o protocolo utilizado para a determinação da DI50 oral for o OECD 423/01 deve se observar, para o cálculo do fator 2, a faixa de exposição e não o cut-off determinado no estudo.

Caso o produto não atenda os critérios estipulados acima o produto deverá ser encaminhado para Fase III.

5.4. Fase III – Relativa a saúde

Quando o produto não for considerado equivalente na Fase II deve se solicitar, com base nos alertas do REA, os estudos necessários para elucidar o incremento de perigo com relação ao produto de referência.

1. Quando houver alerta de carcinogenicidade devem ser considerados os resultados dos estudos de genotoxicidade. Se esses não forem suficientes para elucidar esse endpoint, por exemplo, modo de ação não genotóxico, poderão ser solicitados inicialmente os estudos de toxicidade crônica na espécie em que haja estudo disponível para o produto de referência onde os níveis de dose e o órgão alvo tiverem sido suficientemente estabelecidos e que possam subsidiar a comparação. Deve-se avaliar ainda se o mecanismo de ação predito já está consolidado cientificamente e se não existem múltiplos mecanismos possíveis. Nesse último caso deve-se considerar a real necessidade da solicitação desse estudo, considerando a fragilidade da predição nesses casos.
2. Quando houver alerta de desenvolvimento/reprodução deve ser solicitado estudo de toxicidade sobre o desenvolvimento na espécie em que haja estudo disponível para o produto de referência onde os níveis de dose e o órgão alvo tiverem sido suficientemente estabelecidos e que possam subsidiar a comparação.
3. Quando houver alerta para desrupção endócrina, devem ser solicitados os estudos de acordo com os protocolos validados disponíveis. Caso sejam obtidos resultados positivos o produto é PIOR.

Para a comparação dos resultados dos estudos na Fase III, os resultados dos estudos toxicológicos não devem diferir de um fator maior do que 2 ou, se maior do que 2, o dado deve estar entre o NOAEL ou NOEL do produto de referência e sua dose imediatamente inferior.

Exemplos

Doses do referência

0 3 10 30 (mg/kg pc)

Doses do candidato a equivalente

0 4 16 54 (mg/kg pc)

Se considerarmos o NOAEL do referência igual a 10 mg/kg p.c. e aplicarmos o fator 2, teremos o valor 5 ($10/2 = 5$).

Considerando os seguintes valores de NOAEL:

- 4: embora a dose de 4 mg seja menor do que 5, está contida no intervalo entre o NOAEL do referência (10) e a dose imediatamente inferior utilizada (3) -> ok
- 16: é maior que 5 -> ok

Considerando-se o NOAEL do referência como 30 mg/kg p.c., aplicando-se o fator 2 temos $30/2=15$.

Considerando os seguintes valores de NOAEL:

- 4: é menor que 15 e não está entre 10 e 30 -> não é equivalente



- 16: é maior do que 15 -> ok
- 54: é maior do que 15 -> ok

Não deve haver mudanças na avaliação dos estudos que produzam resultados diferentes dos obtidos no produto de referência.

5.5. Fase III – Relativa ao meio ambiente

Caso a avaliação de Fase III relativa a saúde seja inconclusiva, ou seja, quando não for possível determinar a equivalência ou não equivalência, a avaliação do pleito seguirá para a Fase III relativa aos aspectos do meio ambiente. Neste caso poderão ser solicitados estudos ecotoxicológicos constantes no item 16.9 do Decreto 4.074/02, os quais deverão obedecer aos critérios do item 5.1 do mesmo Decreto.

6. REGISTROS DOCUMENTAIS

- ✓ Nota Técnica
- ✓ Parecer
- ✓ Nota Técnica Comparativa

7. LEGISLAÇÃO DE REFERÊNCIA

- ✓ BRASIL, Lei nº 7802 de 11 de julho de 1989, Presidência da República, DOU - Diário Oficial da União.
- ✓ BRASIL, Decreto nº 4074 de 04 de janeiro de 2002, Presidência da República, DOU - Diário Oficial da União de 08 de janeiro de 2002.
- ✓ BRASIL, Instrução Normativa Interministerial nº 49 de 20 de agosto de 2002, Ministério da Saúde, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e Ministério do Meio Ambiente, DOU - Diário Oficial da União de 21 de agosto de 2002.
- ✓ BRASIL, Portaria nº 03 de 16 de janeiro de 1992, Presidência da República, DOU - Diário Oficial da União.
- ✓ FAO/OMS, Manual sobre elaboración y empleo de las especificaciones de la FAO y de la OMS para plaguicidas, 1ª Edição, Roma-Itália.
- ✓ EEC, Documento de orientação na avaliação de equivalência de materiais técnicos de substâncias regulamentadas sob a Diretiva do Conselho 91/414/EEC. Sanco/10597/2003-revisão 7-final de 6 de abril de 2005.



8. ANEXOS

ANEXO I – Modelo de Nota Técnica



ANEXO II – Modelo de Parecer



ANEXO III – Modelo de Nota Técnica Comparativa

