



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DETERMINACIÓN DE IMPUREZAS RELACIONADAS EN DOS FÁRMACOS EXPERIMENTALES
CONTRA GARRAPATAS**

**INFORME DE INVESTIGACIÓN
PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB ARACELI RIOS ARROYO

Dr. ENRIQUE RAMÓN ÁNGELES ANGUIANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CIUDAD DE MÉXICO, OCTUBRE 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DETERMINACIÓN DE IMPUREZAS RELACIONADAS EN DOS FÁRMACOS EXPERIMENTALES
CONTRA GARRAPATAS**

INFORME DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB ARACELI RIOS ARROYO

Dr. ENRIQUE RAMÓN ÁNGELES ANGUIANO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



Ciudad de México, octubre 2019

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. José Federico del Río Portilla
Vocal:	Dr. Alberto Rojas Hernández
Vocal:	Dra. María Gabriela Vargas Martínez
Vocal:	Dr. Julio Cesar Aguilar Cordero
Secretario:	Dr. Alfonso Sebastián Lira Rocha

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C) campo I, UNAM, bajo la asesoría del Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano, con el apoyo de la beca de maestría otorgada por el CONACYT (CVU: 252472 y No. registro becario: 605646).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y al programa de Posgrado en Ciencias Químicas por haberme permitido formarme y profundizar un poco más en el basto mundo de la química.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) por brindarme los espacios y medios para llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

Al Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría (No. registro becario: 605646).

A la Coordinación de estudio de Posgrado en Ciencias Químicas, por guiarme en cada paso para la obtención de este nivel académico.

A mi asesor de tesis, el Dr. Enrique Ángeles por todo su apoyo y comprensión, por todos sus conocimientos y experiencias compartidas para el desarrollo de esta investigación.

A los miembros del Honorable jurado: Dr. José Federico del Río, Dra. Gabriela Vargas, Dr. Alfonso Lira, Dr. Alberto Rojas y Dr. Julio Cesar Aguilar, por dedicar su valioso tiempo a la revisión de este informe de investigación, sus comentarios enriquecieron mucho este trabajo.

Agradezco a Dios por darme la fortaleza en los momentos de debilidad por estar conmigo en cada paso que doy y por mostrarme su amor a través de las buenas personas que he encontrado en mí andar por esta vida.

Y finalmente, nunca podre dejar de agradecer el amor brindado por mi hermosa familia, han sido mi mayor bendición. Muchas gracias mamá por tu paciencia y amor infinito ahora desbordado hacia mí querida hija Fernanda, muchas gracias Marco y Juan por su apoyo en cada paso que doy, muchas gracias a Mary; mi cuñada y comadre, así como a mis sobrinitas Anita y Sofía, su ternura alegra mi existir.

CONTENIDO DE INFORME DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

DETERMINACIÓN DE IMPUREZAS RELACIONADAS EN DOS FÁRMACOS EXPERIMENTALES CONTRA GARRAPATAS

1. ANTECEDENTES	1
1.1 Impurezas y su normatividad	1
1.2 Garrapatas y su control en la ganadería bovina	5
2. HIPÓTESIS	9
3. OBJETIVOS	9
4. Materiales, reactivos y metodología para la síntesis y purificación de 4-bromofenil carbamato de etilo y de 4-clorofenil carbamato de etilo.	10
5. Materiales, reactivos y metodología para el análisis de impurezas relacionadas del 4-bromofenil carbamato de etilo(LQM-919) y del 4-clorofenil carbamato de etilo(LQM-996) mediante HPLC	12
6. RESULTADOS	17
7. ANÁLISIS DE AVANCES DE INVESTIGACIÓN	32
8. CONCLUSIONES	33
9. PERSPECTIVAS	33
10. REFERENCIAS	34

INFORME DE INVESTIGACIÓN

DETERMINACIÓN DE IMPUREZAS RELACIONADAS EN DOS FARMACOS EXPERIMENTALES CONTRA GARRAPATAS

1. ANTECEDENTES

IMPUREZAS Y SU NORMATIVIDAD

La identificación, cuantificación y control de impurezas en fármacos y medicamentos es un aspecto crucial en el desarrollo farmacéutico para garantizar la calidad y seguridad del producto (NOM-059, 2015).

Las impurezas han sido nombradas de forma diferente por varios grupos de científicos, tan recientemente como en la década de 1990 no se tenía una definición de "impureza" en el mundo farmacéutico. Aquí se describen los términos de uso común y los términos que utilizan los organismos oficiales, como son la Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH) y la Cooperación Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos relativos al Registro de Medicamentos Veterinarios (VICH) que definen como impureza: cualquier entidad de la sustancia farmacéutica (material a granel) o producto farmacéutico (producto en contenedor final) que no es la entidad química definida como la sustancia farmacéutica, un excipiente u otros aditivos para el producto farmacéutico. Esta definición de impureza es lo suficientemente amplia como para incluir a los productos de degradación. Por lo tanto, cualquier material extraño presente en la sustancia farmacológica (fármaco) debe considerarse una impureza incluso si es totalmente inerte o tiene propiedades farmacológicas superiores (Auja, 2003).

Otros términos comunes para impurezas han sido intermedio, penúltimo intermedio, subproducto, producto de transformación, producto de interacción, producto o compuesto relacionado y producto de degradación. Estos términos indican posibles fuentes de impurezas (Lakshmana, 2010).

Intermedio. Los compuestos producidos durante la síntesis del material deseado se denominan intermedios, especialmente si han sido aislados y caracterizados.

Los penúltimos intermedios. Son el último compuesto en la cadena de síntesis antes de la producción del compuesto final deseado.

Los subproductos. Son compuestos no planificados producidos entre la reacción. Puede o no ser posible teorizarlos a todos.

Productos de transformación. Son muy similares a los subproductos que se relacionan con productos teorizados y no teorizados que pueden producirse en la reacción.

Productos de interacción. Productos de interacción que podrían ocurrir entre varios químicos involucrados intencionalmente o no.

Compuestos relacionados. Estos compuestos tienen una estructura química similar y una actividad biológica potencialmente similar al principio activo.

Productos de degradación. Estos compuestos son productos debido a la descomposición del ingrediente activo o fármaco.

La presencia de impurezas tanto en el fármaco como en el producto terminado es relativamente habitual, de ahí que estén controladas de forma rutinaria por especificaciones (Auja, 2003).

Según la normatividad ICH, VICH, Farmacopeas y otras guías de expertos, atendiendo a su estructura química, procedencia y características toxicológicas las impurezas se clasifican en:

- Impurezas orgánicas (relacionadas con proceso y el fármaco)
- Impurezas inorgánicas
- Solventes residuales
- Impurezas mutagénicas

IMPUREZAS ORGÁNICAS: dentro de este grupo se engloban los compuestos orgánicos que proceden de procesos de síntesis o degradación del fármaco o del producto terminado. En el caso de este tipo de impurezas, su número y variabilidad estructural es ilimitado y su toxicidad es generalmente desconocida. Las impurezas relacionadas se pueden considerar como un sinónimo de impurezas orgánicas, debido a que estos compuestos presentan una estructura química análoga a la del fármaco (Auja, 2003).

El análisis de este tipo de impurezas está controlado por una serie de test recogidos en las monografías de las farmacopeas, mientras que la normativa ICH Q3A, ICH Q3B, VICH GL10 y VICH GL11 establece sus límites en función de la cantidad de principio activo o producto terminado que se administra al día.

La normativa que aplica principalmente para este tipo de impurezas es la ICH Q3A y la ICH Q3B para impurezas en fármaco y en medicamento de uso humano respectivamente y la VICH GL 10 y VICH GL 11 para fármaco y medicamento de uso veterinario respectivamente. Estas normativas distinguen tres niveles en la evaluación de impurezas: el **umbral de reporte, el de identificación y el de calificación**. Estos umbrales son valores a partir de los cuales las impurezas deberán ser reportadas o informadas, identificadas y calificadas respectivamente. Se entiende por calificación al proceso de adquisición y evaluación de los datos que definen la seguridad biológica y toxicidad de la impureza al nivel especificado.

Cuando una impureza alcanza o supera el nivel de calificación el fabricante deberá justificar la ausencia de toxicidad del producto. En este sentido y con base en estas guías, cualquier impureza que haya sido adecuadamente evaluada en estudios preclínicos y de seguridad demostrando ausencia de riesgo para la salud se considerara calificada. Cuando los niveles de una impureza no se puedan llevar por debajo del límite de calificación será necesario un estudio de la seguridad a través de una evaluación toxicológica realizada por toxicólogos expertos, siendo necesario en algunos casos la inclusión de datos experimentales de genotoxicidad y de toxicidad en general (VICH GL 10, 2007, VICH GL 11, 2008, ICH Q3A, 2006 ICH Q3B, 2006).

La guía VICH GL 10, 2007 resalta que si se supera el umbral de impurezas de 0.2% será necesario la caracterización estructural de la impureza; es decir, su identificación inequívoca con los métodos instrumentales adecuados, en caso de quedar por debajo de este límite, no será necesaria esta caracterización, porque con las pruebas realizadas para determinar la eficacia y seguridad del nuevo fármaco, significa que las impurezas relacionadas han formado parte de los ensayos clínicos y toxicológicos del mismo; por lo tanto, su presencia a ese nivel es aceptable y seguro (ICH Q3A (R2), 2006, VICH GL 10, 2007).

A continuación se escribe la tabla de la guía ICH Q3A (R2), donde se indican los límites a partir de los cuales se realiza, el reporte o informe, identificación y calificación de alguna impureza relacionada presente en un fármaco de uso humano (Tabla 1).

Tabla 1. Umbrales de impureza relacionada en un fármaco de acuerdo con la guía ICH Q3A (R2)

Máxima dosis diaria ¹	Umbral de reporte ^{2,3}	Umbral de identificación ³	Umbral de calificación ³
≤ 2g/día	0.05%	0.10% o 1.0 mg por de ingesta por día (lo que sea menor)	0.15% o 1.0 mg de ingesta por día (lo que sea menor)
> 2g/día	0.03%	0.05%	0.05%

¹ Cantidad de fármaco administrada por día

² Los umbrales más altos de informe deben estar científicamente justificados.

³ Los umbrales más bajos pueden ser apropiados si la impureza es inusualmente tóxica.

La tabla siguiente se tomó de la guía VICH GL 10 y muestra los umbrales para las impurezas relacionadas de fármacos de uso veterinario. Si el fármaco es de uso humano y animal se utilizan los umbrales indicados en la guía ICH Q3A, es decir, los de la tabla 1.

Tabla 2. Umbrales de impureza relacionada para fármacos de uso veterinario de acuerdo con la guía VICH GL10

Fármaco

Identificación ²	Según ICH* 0.20%**
Reporte ^{1,2}	Según ICH* 0.10% **
Calificación ²	0.50%

*Fármaco usado en medicina humana y veterinaria

**Fármaco no usado en medicina humana

¹ Los umbrales más altos de informe deben estar científicamente justificados.

² Los umbrales más bajos pueden ser apropiados si la impureza es inusualmente tóxica.

IMPUREZAS INORGÁNICAS: son las impurezas elementales potencialmente tóxicas, comúnmente denominadas “metales pesados” que podemos encontrar en los productos farmacéuticos. La normativa que se aplica para limitar la presencia de estas impurezas es la ICH Q3D.

Esta normativa fija una lista de 24 elementos repartidos en cuatro categorías (Clase 1, 2A, 2B y 3), con arreglo a su toxicidad y a su probabilidad de ocurrencia así como a la dosis diaria máxima admisible (PDE: Permitted Daily Exposure) para cada impureza según la vía de administración (µg/día).

Clase 1: demostrada toxicidad. Uso limitado o nulo en fabricación de medicamentos (As, Cd, Hg, Pb).

Clase 2: toxicidad según la vía de administración. Clase 2A (Co, Ni, V). Clase 2B son añadidos intencionalmente (Ag, Au, Ir, Os, Pd, Pt, Rh, Se y Tl).

Clase 3: Baja toxicidad oral (Li, Sb, Ba, Mo, Cu, Sn, Cr).

ICH Q3D sólo indica valores de PDE para los productos administrados por vía oral, parenteral o por inhalación.

Los productos que no se administren por estas vías no son excluidos de la directiva ICH Q3D, sino que habra que calcular el PDE para cada elemento por la vía de administración correspondiente.

SOLVENTES RESIDUALES: los disolventes utilizados en la industria farmacéutica son compuestos orgánicos generalmente volátiles que están involucrados en multitud de procesos de síntesis y purificación de fármacos, excipientes y medicamentos.

Es fundamental la identificación de los residuos que puedan aparecer dada la toxicidad de algunos disolventes y la posible modificación de la eficacia y seguridad del fármaco.

Según la guía ICH Q3C, los disolventes se pueden clasificar en tres categorías atendiendo a su toxicidad:

Disolventes clase 1: son compuestos potencialmente carcinogénicos y con efectos tóxicos para el medio ambiente. Se recomienda evitar su uso, no obstante, la guía recomienda límites de seguridad para cuando su utilización resulte imprescindible.

Disolventes clase 2: la guía recomienda límites de seguridad determinados también para estos disolventes, que presentan potencial carcinógeno no genotóxico y posibles efectos neurotóxicos o reprotóxicos.

Disolventes clase 3: tienen un potencial tóxico bajo, con resultados negativos en estudios de genotoxicidad y baja toxicidad en estudios de toxicidad aguda o en dosis repetidas. Para estos disolventes se asume que niveles por debajo de los 50 mg al día no conllevan riesgo para la salud.

Disolventes sin clase: en el caso de los disolventes que no tienen un PDE definido por la ICH Q3C, se deberá calcular un valor de seguridad con base en los datos toxicológicos disponibles.

IMPUREZAS MUTAGÉNICAS: son un tipo de impurezas orgánicas que podemos encontrar en un fármaco o medicamento y cuya principal característica es que pueden alterar el material genético (ADN) del paciente. El flujo de trabajo para la evaluación de este tipo de impurezas está recogido en la guía ICH M7.

Se denomina impureza mutagénica a la sustancia que tiene potencial para actuar directamente sobre el ADN dañándolo incluso a dosis bajas, por lo que podrían ser potenciales causantes de cáncer.

La evaluación de este tipo de impurezas requiere una identificación previa de impurezas reales/potenciales y la posterior búsqueda bibliográfica de datos de carcinogenicidad y mutagenicidad y/o la realización de estudios preclínicos.

En ausencia de datos precisos de mutagenicidad y carcinogenicidad, se recomienda realizar un análisis QSAR ("Quantitative Structure Activity Relationship"), tanto a nivel estadístico ("statistical QSAR") como a nivel experto ("rulebased QSAR").

Los resultados obtenidos tras la evaluación permiten clasificar la impureza dentro de una clase entre la 1 y la 5 según la guía ICH M7:

Clase 1 y 2: engloban respectivamente a los compuestos mutagénicos y carcinogénicos (clase 1) y a los que son sólo mutagénicos (clase 2).

Clase 3: impurezas para las que no hay datos de mutagenicidad disponibles y las alertas QSAR de mutagenicidad no son compartidas entre la impureza y el fármaco.

Clase 4: impurezas para las que no hay datos de mutagenicidad disponibles pero aparecen alertas QSAR compartidas tanto en la impureza como en el fármaco.

Clase 5: compuestos que no muestran mutagenicidad o potencial de carcinogenicidad.

Una vez clasificadas las impurezas, se realizara un analisis de riesgos para definir los límites de seguridad de los compuestos en las clases 1 y 2.

Los umbrales se estableceran caso por caso mediante la determinación de Ingesta Admisible (AI) o Exposiciones Diarias Permitidas (PDE) derivadas de estudios preclínicos.

Finalmente es importante desarrollar una estrategia de control que asegure que la presencia de impurezas mutagénicas en el producto farmacéutico este debajo del límite aceptable. Para ello la guía ICH M7 propone varias estrategias de control diferentes, que abarca desde un control del producto terminado mediante especificación, hasta la justificación de “no control” siempre y cuando se demuestre la purga eficiente de la imureza mutagénica a lo largo del proceso y por tanto su ausencia en el producto final (ICH M7, 2017).

GARRAPATAS Y SU CONTROL EN LA GANADERÍA BOVINA

El 80% de la ganaderia a nivel mundial enfrenta un enemigo común, las garrapatas. Este problema esta presente en casi todos los países del hemisferio occidental y afecta la salud y el bienestar rural, el suministro de proteínas de calidad y la productividad de este rubro estratégico para la economía de muchas naciones (Benavides, O. E. et al., 2016).

Las garrapatas son artrópodos pertenecientes a la clase de los arácnidos; son ectoparásitos obligados, que se alimentan principalmente de sangre de los vertebrados (hematófagos), especialmente mamíferos y aves. Son relativamente grandes y de estadios longevos, de alimentación periódica, teniendo grandes ingestas de sangre. Las mordeduras de garrapata pueden dañar directamente a los animales, causando irritación, inflamación o hipersensibilidad, y cuando se presenta un gran número de garrapatas, puede haber anemia. Las secreciones salivales de las garrapatas pueden causar toxicosis y parálisis; sin embargo, más importante aún, cuando se adhieren y alimentan son capaces de transmitir una serie de enfermedades como la babesiosis bovina y la anaplasmosis, ocasionando la muerte y generando una gran cantidad de animales improductivos, repercutiendo directamente en la economía de los ganaderos. (Rodríguez-Vivas, et al., 2012).

La garrapata *R. microplus* también conocida como *Boophilus microplus* es la más común en los bovinos, es la garrapata más dañina en América Latina, Australia y varias islas del Pacífico. Cada hembra de *Boophilus microplus* ponen alrededor de 4 000 huevecillos, de los cuales, dependiendo de las condiciones climáticas, en 7 días saldrán las larvas que se subirán al primer bovino que pase.

Una vez arriba de éste, se alimentan con sangre y sufren diferentes cambios: de larva a metalarva, de metalarva a ninfa, de ninfa a metaninfa y de ésta a adulto, que copulará con un macho, para posteriormente dejarse caer y ovipositar, cerrándose así el ciclo, que en total dura sobre el animal aproximadamente 21 días (Figura 1) .

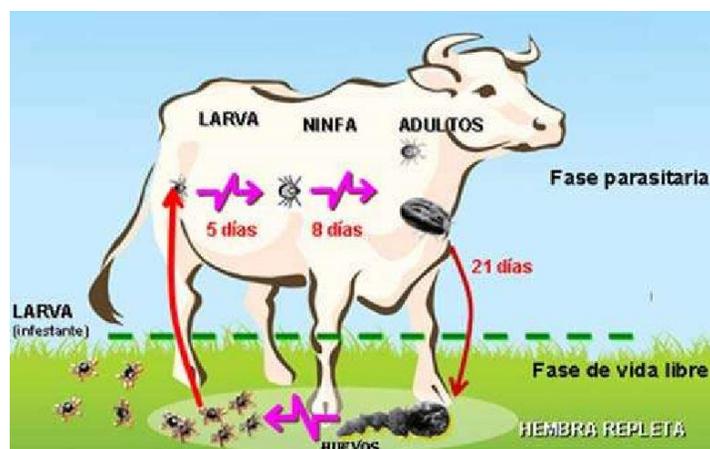


Figura 1. Ciclo de vida de la garrapata *Boophilus microplus*

A pesar de cuantiosas inversiones en la investigación y desarrollo de nuevos productos y en campañas de erradicación, las garrapatas *Boophilus microplus* siguen siendo una de las plagas más dañinas del ganado. Su control es complejo debido a que hay muchos factores que juegan un papel importante como son las condiciones climáticas y factores ecológicos, la raza del ganado, la presencia o no de otras especies de garrapatas y principalmente la resistencia de las garrapatas *Boophilus* a muchos ixodicidas.

La resistencia de *Boophilus microplus* a los acaricidas está muy extendida en Latinoamérica y Australia. Se trata sobre todo de resistencia a los organoclorados, a los organofosforados, a los piretroides sintéticos y a las amidinas, principales compuestos usados para su control.

Debido a la resistencia cruzada, todos los compuestos de estas clases químicas mencionadas se ven afectados por la resistencia. No son raros los casos de poblaciones de garrapatas multirresistentes.

En México durante el año de 1993, se identificaron focos de resistencia de las garrapatas *Boophilus* spp., a productos de las familias de los organofosforados y piretroides en unidades de producción de los estados de San Luis Potosí, Veracruz y Tabasco debido a esto SAGARPA-SENASICA implemento la NOM-019-ZOO-1994 que se refiere a la campaña nacional contra la garrapata *Boophilus spp* de esta forma la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural fomenta la producción pecuaria y consecuentemente el diagnóstico, la prevención, control y erradicación de enfermedades y plagas, como es el caso de las garrapatas del género *Boophilus*, que afectan a la ganadería nacional, tanto en su nivel de producción como en la calidad de sus productos, además de que limitan la introducción de razas altamente especializadas en la producción de leche y carne (SAGARPA-SENASICA, 1994).

La campaña se orienta a erradicar a la garrapata *Boophilus microplus*, así como a evitar la reinfestación de áreas libres de este parásito, además realiza su control constante en todo el país, bajo autorización y supervisión de la Secretaría (SAGARPA-SENASICA, 1994).

Para efectos de esta campaña se reconocen las fases de control, erradicación y libre de la garrapata *Boophilus* spp., que podrán ser consideradas a nivel municipal, regional o estatal y cada año se genera un mapa que muestra la situación actual del control de la garrapata *Boophilus* spp (fig 2).



Figura 2. Territorio nacional donde se muestran las zonas de control, erradicación y libre de garrapata *Boophilus spp.* (SENASICA-SAGARPA, 2018).

Fase de control: son las actividades de promoción, aplicación de tratamientos estratégicos y selectivos, control de la movilización, así como contar con un sistema de muestreo y monitoreo para realizar la vigilancia de la infestación del ganado por garrapatas, las enfermedades que transmiten, así como la resistencia de las garrapatas a los ixodicidas.

La **fase de erradicación** incluye: Actividades de promoción, aplicación de tratamientos sistemáticos, control de la movilización y contar con un sistema de muestreo y monitoreo para realizar la vigilancia de la infestación del ganado por garrapatas, las enfermedades que transmiten, así como la resistencia de las garrapatas a los ixodicidas.

La **fase libre** incluye: La ausencia de la garrapata *Boophilus spp.*, en el área o región ya sea en forma natural o por las acciones de la campaña, comprobada mediante la inspección oficial del ganado durante dos veranos y un invierno intermedio. Control de la movilización y contar con un sistema de muestreo y monitoreo para la vigilancia epidemiológica de la infestación del ganado por garrapatas.

Teniendo en cuenta que uno de los pilares de la campaña para el combate a la garrapata *Boophilus microplus* es el uso de ixodicidas, se ha impulsado la investigación de moléculas nuevas que sean capaces de eliminar a este parásito. En la UNAM se han sintetizado y evaluado N-carbamatos de etilo y metilo los cuales han mostrado ser efectivos contra la cepa *Boophilus microplus* (Prado-Ochoa, et al, 2014.I.E. Pérez-González, et al. 2014), dos de estos N-carbamatos lograron el 100% de mortalidad en las larvas de estos ectoparásitos y el 99.5% de efectividad en la garrapata adulta, siendo los N-carbamatos 4-bromo fenil carbamato de etilo (LQM-919) y 4-cloro fenil carbamato de etilo(LQM-996) los que han resultado altamente efectivos contra cepas resistentes a ixodicidas empleados en la actualidad (Prado-Ochoa, 2014) (Figura 3) .

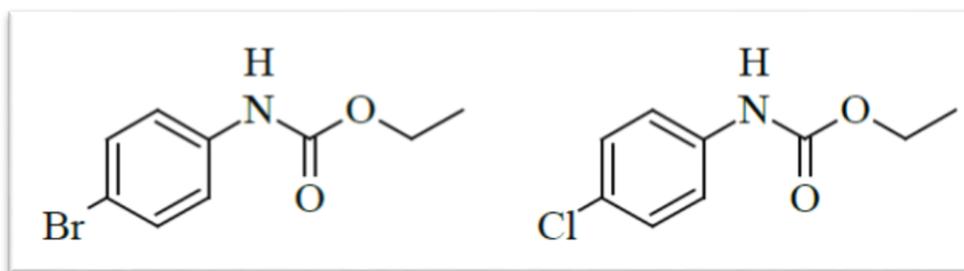


Figura 3. Compuestos 4-Bromofenil carbamato de etilo (LQM-919) y 4-Clorofenil carbamato de etilo (LQM-996)

Los carbamatos se clasifican en O-carbamatos y N-carbamatos y se han usado ampliamente en la agricultura debido a su actividad biológica, bajo potencial de bioacumulación y relativamente baja toxicidad de mamíferos. Los O-carbamatos actúan como inhibidores de la acetilcolinesterasa, por lo que se vigila su potencial para inducir toxicidad neurológica (Ouertani Randa et al, 2016. Hemingway, Rachel et al. 2017), y en el caso de los N-carbamatos LQM-919 y LQM-996, las investigaciones han demostrado que su mecanismo de acción es por inhibición de la vitogénesis de la garrapata, por lo tanto se plantean como fármacos más seguros (). Conjuntamente se han realizado pruebas de toxicidad para evaluarlos como alternativa a los ixodidas empleados hoy en día en el ganado y se ha comprobado que presentan un riesgo de toxicidad agudo bajo por vía oral y dérmica (Prado-Ochoa, 2014).

Un tema especialmente importante en la fabricación de fármacos y medicamentos de uso humano y veterinario es garantizar la seguridad del paciente al usar estos productos y en México el organismo encargado de asegurar el cumplimiento de las leyes de protección al paciente es la COFEPRIS (Comisión Federal para la protección contra Riesgos Sanitarios), que depende de la Secretaría de Salud, y que ha elaborado Normas Oficiales como la NOM-059, NOM-073 y NOM-164, que son las regulaciones técnicas de observancia obligatoria, que establecen las especificaciones, atributos, directrices y características aplicables a la elaboración de fármacos y medicamentos. Y entre las directrices para el registro de fármacos de uso humano y veterinario está el demostrar mediante pruebas analíticas que la presencia de impurezas se encuentra controlada.

La elaboración de fármacos debe controlarse con miras a garantizar que son seguros, puros y eficaces, tiene que cumplirse con todo su rigor científico, técnico y moral. Para asegurar la calidad de los fármacos, deben monitorearse las impurezas relacionadas cuidadosamente durante el desarrollo del proceso (NOM-059, 2015).

En el marco de lo antes mencionado, en este informe de trabajo se mostrará el avance en la adecuación del método analítico para la determinación de impurezas relacionadas provenientes de las etapas de síntesis y posterior purificación por medio de recristalizaciones independientes utilizando diferentes disolventes, en dos fármacos experimentales el 4-bromo fenil carbamato de etilo (LQM-919) y el 4-clorofenil carbamato de etilo, diseñados en la UNAM contra garrapatas del género *Boophilus microplus*, parásito del ganado bovino que se encuentra dentro de las prioridades de combate a enfermedades que impactan la industria ganadera de nuestro país.

2. HIPÓTESIS

Si en los procesos de síntesis de compuestos orgánicos el rendimiento es menor al 100%, entonces el producto obtenido tendrá un porcentaje de impurezas propias de los materiales de partida, subproductos de reacción y/o productos de degradación, los cuales pueden ser evaluados utilizando un método analítico de separación como es el HPLC.

3. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar las condiciones adecuadas de un método analítico por HPLC para identificar las impurezas relacionadas de dos carbamatos experimentales con actividad ixodicida, así como cuantificar el porcentaje de las mismas; con la finalidad de contar con un método analítico para el control de calidad de los principios activos.

Objetivos particulares

- Realizar la síntesis orgánica de dos fármacos experimentales; el 4-bromofenil carbamato de etilo y el 4-cloro fenil carbamato de etilo a través de una reacción del 4-bromoanilina y 4-cloroanilina con cloroformiato de etilo.
- Usar diferentes disolventes para la purificación por recristalización de los carbamatos sintetizados.
- Implementar una metodología para el estudio de los compuestos mediante la técnica de HPLC.
- Determinar mediante HPLC el nivel de impurezas relacionadas obtenidas durante la síntesis y purificación de los carbamatos en estudio.

4. MATERIALES, REACTIVOS Y METODOLOGÍA PARA LA SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DE 4-BROMOFENIL CARBAMATO DE ETILO Y DE 4-CLOROFENIL CARBAMATO DE ETILO.

Tabla 3. Reactivos utilizados para la síntesis de los carbamatos LQM-919 Y LQM-996

Reactivo	Lote	Marca	Pureza
Cloroformiato de etilo	09515EE CAS 541-41-3	Aldrich Chemistry	97%
4-Cloroanilina	BCBP0876V CAS 106-47-8	Aldrich Chemistry	98%
4-Bromoanilina	10329LE CAS 106-40-1	Aldrich Chemistry	97%
Carbonato de sodio	M081641 CAS 497-19-8	Meyer	99.5%
Acetona RA	-	-	-

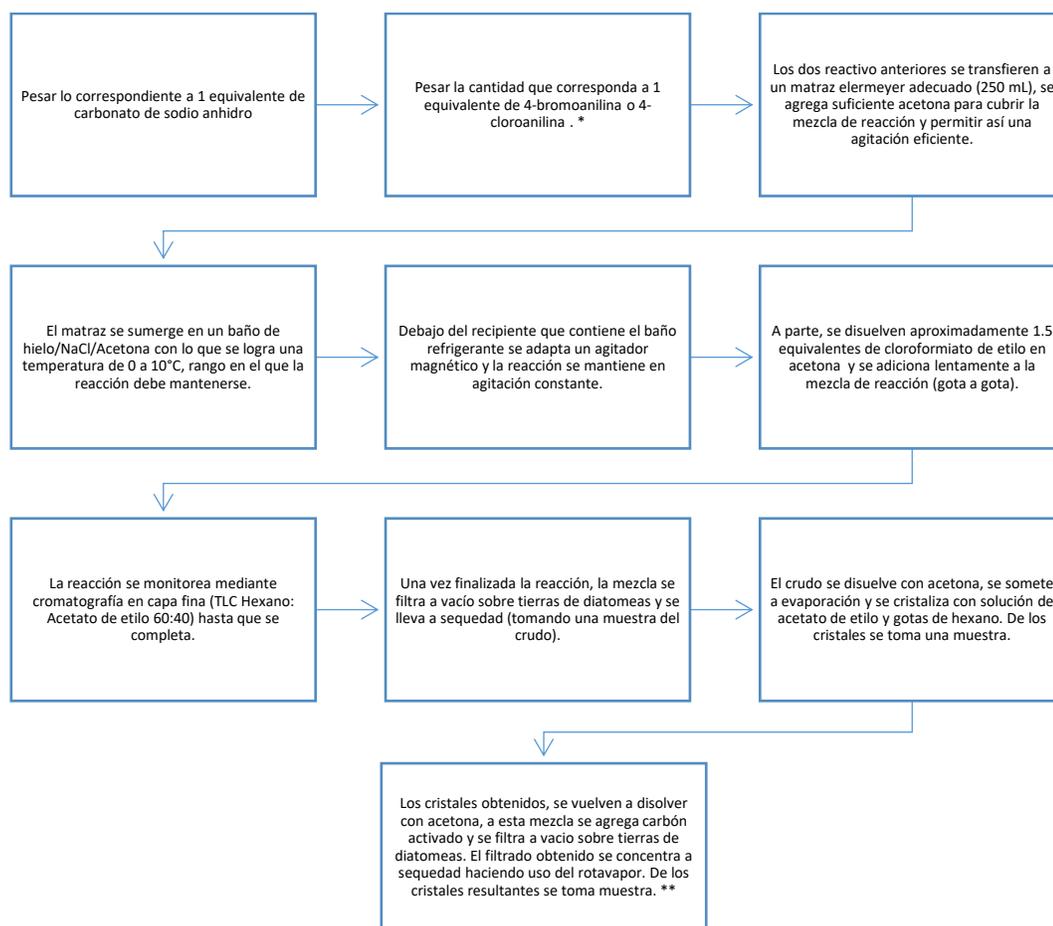
Tabla 4. Reactivos utilizados para la purificación de los carbamatos LQM-919 Y LQM-996

Reactivos
<ul style="list-style-type: none"> • Acetona • Tierras de diatomeas • Etanol • Agua desionizada • Acetato de etilo • Hexano • Carbón activado

Tabla 5. Equipos y material para la síntesis y purificación de los carbamatos LQM-919 y LQM-996

MATERIAL Y EQUIPO
<ul style="list-style-type: none"> • Matracas elermeyer (50, 250 y 500ml) • Vasos de precipitado • Barras magnéticas • Embudos • Matraz kitazato • Evaporador rotativo (rotavapor) Buchi® modelo R-210 • Bomba de filtración • Agitador magnético • Lampara UV Mineralight modelo UVGL • Balanza Ohaus modelo AP110

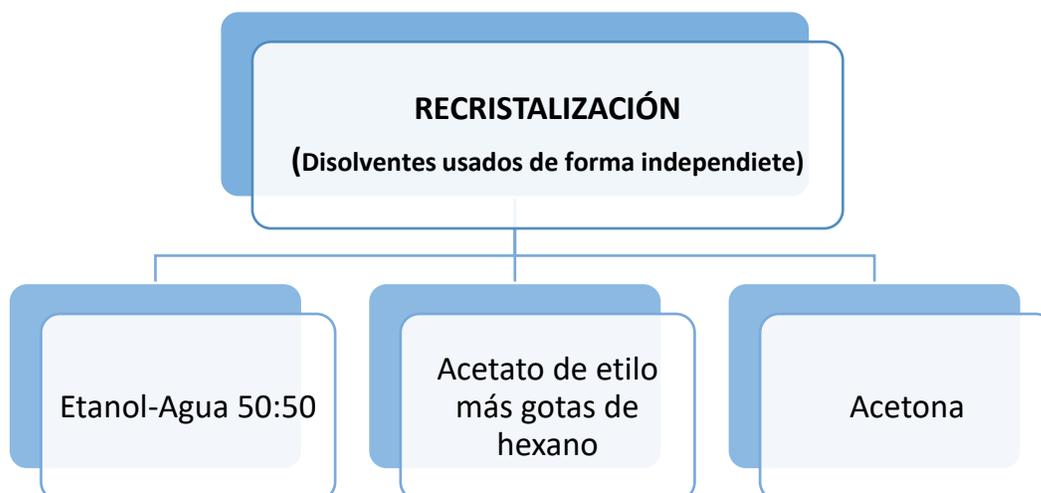
Metodología para la síntesis de los carbamatos LQM-919 Y LQM-996



** El procedimiento se realiza rápidamente en un vaso de precipitado cubierto con papel aluminio para evitar auto oxidación de la amina. Inmediatamente después de pesarse se adiciona al vaso un poco de acetona, con lo que se evita un contacto prolongado con la atmosfera.*

***Esta muestra se purifica por recristalización.*

Metodología para la purificación de los carbamatos LQM-919 Y LQM-996



5. MATERIALES, REACTIVOS Y METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE IMPUREZAS RELACIONADAS DEL 4-BROMOFENIL CARBAMATO DE ETILO(LQM-919) Y DEL 4-CLOROFENIL CARBAMATO DE ETILO(LQM-996) MEDIANTE HPLC.

Tabla 6. Reactivos para análisis de impurezas relacionadas.

Reactivo	Lote	Marca
Metanol HPLC	A13C44	J.T. Baker
Acetonitrilo HPLC	Y27C61	J.T. Baker
Agua desionizada	N/A	N/A

Tabla 7. Sustancias de referencia para análisis de impurezas relacionadas de los carbamatos LQM-919 Y LQM-996

Sustancia de referencia	Lote	Marca	Pureza
4-cloroanilina	LRAA9015 CAS 106-47-8	SIGMA-ALDRICH	98%
4-bromoanilina	BCBW0101 CAS 106-40-1	ALDRICH	>99%
4-clorofenil carbamato de etilo	S361577 B02589066	SIGMA-ALDRICH	>99%
4-bromofenil carbamato de etilo	S666599 B02589588	SIGMA-ALDRICH	>99%

Tabla 8. Material para análisis de impurezas relacionadas de los carbamatos LQM-919 Y LQM-996

Material	Capacidad	Unidades
Matraces volumétricos	5	mL
	10	
	25	
Micropipetas	100	μL
	1000	
Membrana sartorius	0.45	μm
Acrodiscos	0.45	μm
Viales para HPLC	2	mL
Vasos de precipitado	250	mL

Tabla 9. Instrumentación para análisis de impurezas relacionadas de los carbamatos LQM-919 Y LQM-996

Instrumentación
Cromatógrafo de líquidos UPLC, Waters Acquity con detector de arreglo de diodos (PDA)
Bomba de filtración KNF Labopor
Balanza analítica AGZN200

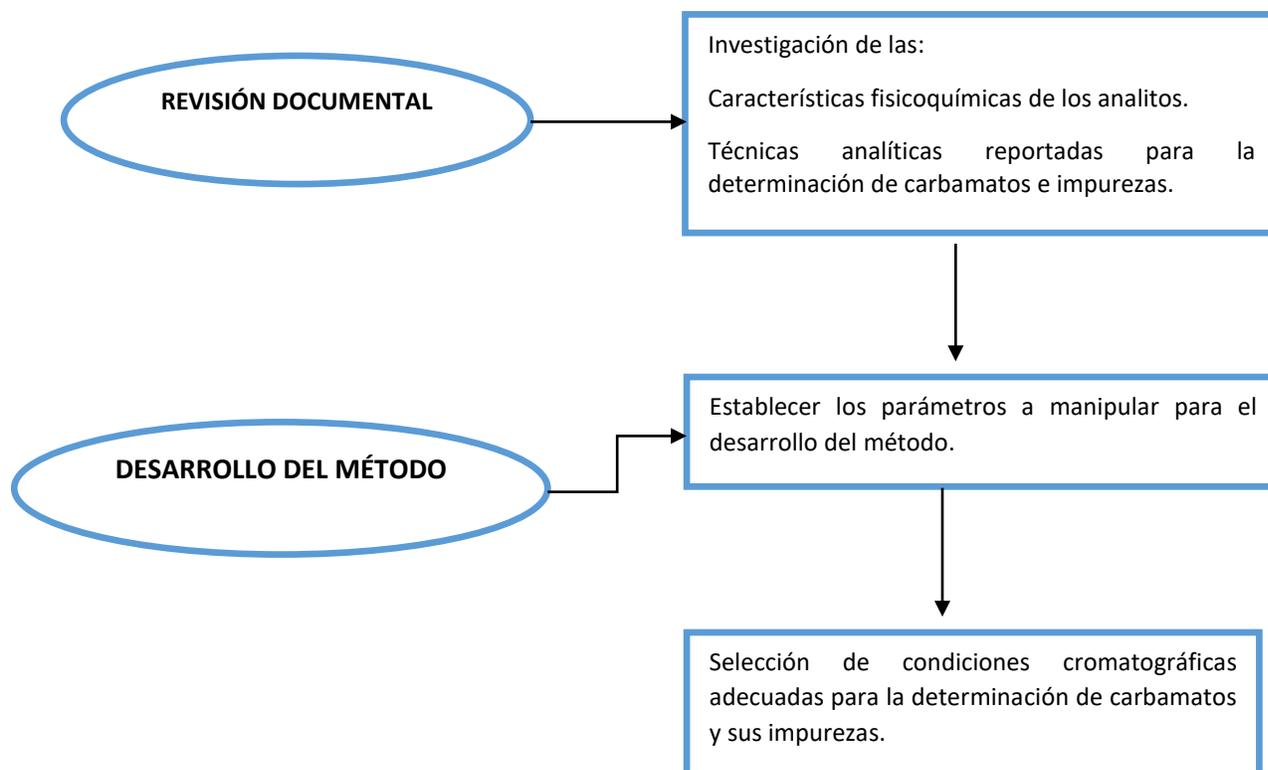
Tabla 10. Fase estacionaria para análisis de impurezas relacionadas de los carbamatos LQM-919 Y LQM-996

Fase estacionaria
Columna Phenomenex Kinetex C18 2.6µm X 100 Å X 100 mm X 4.6 mm No. Parte. 00D-4462-E0 No. Serie. H19-096038 No. Lote. 5569-0248
Columna Symmetry C18 5 µm X 250 X 4.6 mm No. Parte. WAT054275 No. Serie. T83381S 18

Tabla 11. Información de las muestras investigadas.

NOMBRE DEL PRODUCTO	DISOLVENTE ENMPLEADO PARA LA RECRISTALIZACIÓN	CLAVE
4-Clorofenil carbamato de etilo	mezcla etanol:agua 50:50	LQM-996
4-Clorofenil carbamato de etilo	acetato de etilo y gotas de hexano	LQM-996
4-Clorofenil carbamato de etilo	Acetona.	LQM-996
4-Bromofenil carbamato de etilo	mezcla de etanol:agua 50:50	LQM-919
4-Bromofenil carbamato de etilo	acetato de etilo y gotas de hexano	LQM-919
4-Bromofenil carbamato de etilo	Acetona	LQM-919

Metodología para determinar impurezas relacionadas por HPLC



Preparación de la Fase móvil

La fase móvil que se utiliza es una mezcla de diferentes proporciones de metanol, agua y acetonitrilo. La variación en las proporciones se realizó con el fin de encontrar parámetros adecuados de análisis como son la resolución y los platos teóricos.

Preparación de soluciones prueba.

En un principio se utilizó como diluyente una mezcla 1:1 metanol: agua y se observó que a concentraciones elevadas de los carbamatos no se lograba adecuada solubilidad, así se optó por utilizar únicamente metanol al 100% como diluyente, preparándose las siguientes soluciones para ir comprobando la factibilidad del método.

Tabla 12. Soluciones preparadas con los estándares para el análisis de impurezas relacionadas.

Soluciones de referencia preparadas	Concentraciones ($\mu\text{g/mL}$)
p-bromoanilina	1000
p-cloroanilina	40
p-bromofenil-N-carbamato de etilo	1
p-clorofenil-N-carbamato de etilo	

Preparación de soluciones de las muestras (1000 µg/mL)

- Pesar 25mg de muestra (producto de síntesis impuro y resucristalizado con diferentes disolventes) en matraz volumétrico de 25 mL.
- Disolver y aforar con diluyente.
- Filtrar por membrana de 0.45 µm.
- Sonicar solución por 10 minutos.
- Analizar solución por triplicado

Diseño de monitoreo (Factorial 2ⁿ)

Para ayudar con la elección de las condiciones adecuadas de análisis se elaboró un diseño experimental de monitoreo, en la tabla 14 se muestran los factores y niveles empleados.

Tabla 13. Investigación de variables y sus niveles de estudio en un diseño factorial 2ⁿ

Codificación de variables	Factores	Unidades	Valor mínimo (-1)	Valor máximo (+2)
X ₁	Proporción de solventes	%	38:62 Agua:ACN ¹	38:31:31 Agua:Metanol:ACN ¹
X ₂	Vel de flujo	mL/min	0.8	1.4
X ₃	Temperatura de columna	°C	25	35

¹ ACN= Acetonitrilo

Después de realizar pruebas para determinar condiciones adecuadas para el análisis de los carbamatos experimentales y sus impurezas se usaron las siguientes condiciones para la mayor parte de la experimentación.

Tabla 14. Condiciones del equipo

Columna analítica	Columna Phenomenex Kinetex 2.6µm C18 100 mm
Longitud de onda	PDA/UV-Vis (190-400nm) y a 242nm
Temperatura de la columna	35°C
Tiempo de corrida	4 minutos
Velocidad de flujo	1.5 mL/min
Volumen de inyección	5 µL
Fase móvil	A:38% Agua B: 31% Metanol C: 31% Acetonitrilo
Tipo de análisis	Isocrático

Resolución entre impureza y su carbamato ≥ 1.5, factor de coeol ≤ 2.0 y platos teóricos ≥ 1 500

Después de elegir condiciones adecuadas de análisis para la determinación de las impurezas relacionadas de los carbamatos LQM-919 y LQM-996 (Tabla 14), se realizaron las siguientes pruebas

para confirmar experimentalmente que el método analítico es adecuado para dicho propósito y de esta forma obtener resultados confiables (con base en la guía de validación de métodos analíticos, editada por El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos).

Adecuabilidad del sistema (repetibilidad).

- Preparar una solución que contenga 1 µg/mL de 4-cloroanilina y 1 µg/mL 4-clorofenilcarbamato de etilo utilizando metanol como diluyente.
- Preparar una solución que contenga 1 µg/mL de 4-bromoanilina y 1 µg/mL 4-bromofenilcarbamato de etilo utilizando metanol como diluyente.
- Filtrar cada solución por acrodisco de 0.45 µm, pasar a vial.
- Inyectar por sextuplicado.
- **Criterio de aceptación:** el coeficiente de variación (%CV) debe ser ≤ 2.0 %, resolución ≥ 2.0 , factor de coeleo ≤ 2.0 y número de platos teóricos ≥ 2000 .

Precisión del sistema.

- Preparar por dilución y por sextuplicado disoluciones de los estándares 4-clorofenil carbamato de etilo y 4-bromofenil carbamato de etilo a concentración de 2 µg/mL utilizando metanol como diluyente.
- Filtrar cada solución por acrodisco de 0.45 µm, pasar a vial.
- Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones.
- **Criterio de aceptación:** el coeficiente de variación (%CV) debe ser ≤ 1.5 %.

Linealidad del sistema.

- Se preparan por triplicado 5 niveles de concentración de la disolución de referencia por dilución (a partir de una misma solución concentrada). El intervalo incluye las concentraciones esperadas del analito.
- Los 5 niveles son a 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 y 4.0 µg/mL a partir de una solución concentrada de los estándares de referencia de 4-clorofenil carbamato de etilo y 4-bromofenil carbamato de etilo.
- Medir la respuesta analítica bajo las mismas condiciones de medición, reportar la relación concentración contra respuesta analítica. Se calcula el valor de la pendiente (b_1) de la ordenada al origen (b_0), el coeficiente de determinación (r^2) y el intervalo de confianza para la pendiente (IC (β_1)).
- **Criterios de aceptación:** $r^2 \geq 0.98$ para métodos por CLAR, IC (β_1), no incluye al cero.

Especificidad.

- Se prepara una solución estándar del analito (4-clorofenil carbamato de etilo y/o 4-bromofenil carbamato de etilo) a concentración de 2 µg/mL utilizando metanol como diluyente y su respuesta se compara con la del diluyente solo.
Criterios de aceptación: el diluyente no debe presentar ningún tipo de señal que interfiera con la señal que se encuentra para el estándar.
 - Se prepara una solución estándar del analito (4-clorofenil carbamato de etilo y/o 4-bromofenil carbamato de etilo) a 2 µg/mL y una solución de muestra a la misma concentración. Se lleva a cabo una comparación de las mediciones de ambas soluciones.

- **Criterios de aceptación:** la solución de la muestra sintetizada (LQM-919 y LQM-996) debe presentar el mismo tiempo de retención que la señal de la solución del estándar respectivo.
- Se prepara una solución estándar del analito (4-clorofenil carbamato de etilo y/o 4-bromofenil carbamato de etilo) con su materia prima (4-cloroanilina y 4-bromoanilina) de origen a 1 µg/mL se lleva a cabo una comparación con el diluyente.
- **Criterio de aceptación:** se debe obtener un tiempo de retención específico para el analito y su materia prima de origen con una resolución ≥ 2.0 .
- Realizar el ensayo de pureza de picos con el detector de arreglo de diodos (PDA).
- **Criterio de aceptación:** se considera un pico espectralmente puro cuando la señal es únicamente para el o los compuestos de interés. La pureza de pico con el software *Empower* tiene el siguiente criterio: ángulo de pureza < ángulo de ruido (Umbral de pureza).

Límite de detección (LD).

La estimación del límite de detección del método de ensayo, se determina a través de la desviación estándar residual de la linealidad del sistema y la pendiente de la curva de calibración. El cálculo se realiza utilizando la siguiente fórmula: $LD=3.3 S/b_1$

Límite de cuantificación (LC).

La estimación del límite de cuantificación del método de ensayo, se determina a través de la desviación estándar residual de la linealidad del sistema y la pendiente de la curva de calibración. El cálculo se realiza utilizando la siguiente fórmula: $LC=10 S/b_1$

Criterio de aceptación para LD y LC: se debe obtener un valor menor o igual que la especificación $\leq 0.10\%$.

Exactitud del punto intermedio.

- Se prepara por sextuplicado la solución del analito a 2 µg/mL a partir de una solución stock de referencia y de igual forma se prepara por sextuplicado una muestra a la misma concentración.
- **Criterio de aceptación:** el promedio de porcentaje de recobro se encuentra entre 90 a 110%.

6. RESULTADOS

En el Laboratorio de Química Medicinal (LQM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM se han sintetizado y caracterizado carbamatos identificados como la serie LQM-900 que han presentado actividad antiparasitaria, antibacteriana y antimicótica; destacando, la actividad ixodicida de los carbamatos en estudio.

Se sintetizaron los carbamatos 4-Bromofenil carbamato de etilo (LQM-919) y el 4-Clorofenil carbamato de etilo (LQM-996), vía una reacción acil nucleofílica en donde el par de electrones libres del nitrógeno de la amina ataca al centro electrofílico del grupo carbonilo del cloroformiato de etilo, desplazando un par de electrones al átomo de oxígeno, formándose un intermediario tetraédrico al regresar los electrones desplazados al oxígeno, se forma de nuevo el grupo carbonilo y se elimina de la molécula el átomo de cloro, que es un buen grupo saliente (Figura 4)(Tabla 15).

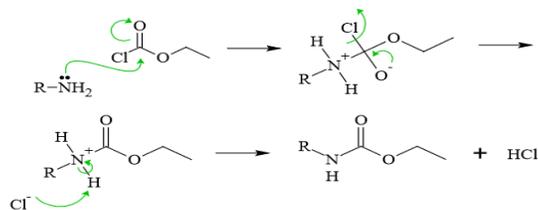
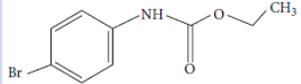
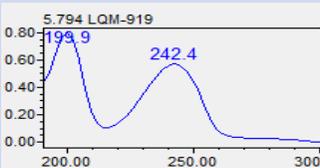
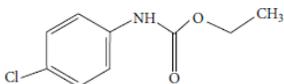
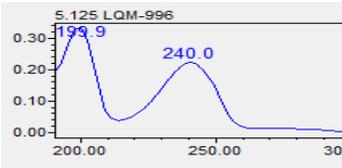


Figura 4. Mecanismo de reacción propuesto.

Apariencia: Los carbamatos LQM-996 y LQM-919 son cristales blancos en forma de aguja con brillo.

Solubilidad: Insolubles en agua. Solubles en dimetil sulfoxido, metanol, etanol, acetona, acetato de etilo.

Tabla 15. Características fisicoquímicas de los carbamatos en investigación.

CÓDIGO LQM	Estructura química	Espectro de absorción UV	T fusión (°C)	Rendimiento
LQM-919	 <p>4-Bromofenil carbamato de etilo PM=244.09</p>		78-80	90.2%
LQM-996	 <p>4-Clorofenil carbamato de etilo PM=199.63</p>		68-70	93.6%

De la síntesis de los carbamatos LQM-919 y LQM-996 se obtuvieron muestras de productos sin purificar y de los compuestos purificados por recristalización usando diferentes disolventes para evaluar la cantidad de impurezas presentes después de sintetizar y purificar los compuestos.

Como lo indica la guía ICH Q3A para nuevos fármacos de uso humano y la guía VICH GL10 para nuevos fármacos sintetizados para uso veterinario es necesario investigar la seguridad al emplear una nueva sustancia activa y de los compuestos relacionados que la acompañan. Investigar si el nivel de las diferentes impurezas presentes amerita que se reporten, se identifiquen o sea necesario calificar

de forma individual determinada impureza.

El interés de esta investigación fueron las impurezas orgánicas; es decir, las impurezas relacionadas provenientes de la síntesis, que dependiendo de su porcentaje en los fármacos pueden representar un riesgo para la salud de los pacientes.

Se realizaron algunas pruebas iniciales para determinar la factibilidad del empleo de la técnica de cromatografía en fase reversa para la detección y cuantificación de las impurezas orgánicas de la síntesis en los carbamatos LQM-919 Y LQM-996 como fue la obtención del espectro electromagnético de cada carbamato en estudio y su materia prima precursora; es decir, la p-bromoanilina y la p-cloroanilina respectivamente (Figura 5). Observando que tienen un espectro muy parecido con un nivel máximo de absorbancia próximo a 242 nm.

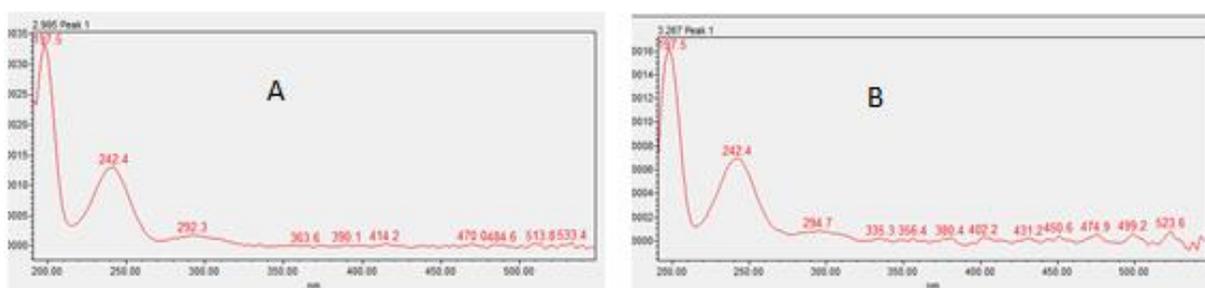


Figura 5. Epectro UV de p-bromoanilina (A) y p-cloroanilina (B) en metanol.

Para el desarrollo del método analítico se probó como fase móvil una mezcla de Agua: Acetonitrilo (38:62) y mezcla Agua:Acetonitrilo:Metanol (38:31:31), disolventes comúnmente empleados para el análisis de pesticidas carbamatos.

Para determinar condiciones de análisis adecuadas se planteo un diseño experimental de monitoreo 2^3 , efectuando variaciones en factores importantes durante un análisis por HPLC, como son la velocidad de flujo, la temperatura y los disolventes utilizados. Para estos experimentos de monitoreo se utilizó una columna Symmetry C18. A continuación se muestra la tabla de los experimentos realizados para los dos fármacos en investigación (Tabla 16 y 17).

Tabla 16. Diseño de experimento para LQM-919

EXP Y REPLICA	FACTOR A (% METANOL)	FACTOR B (VEL FLUJO mL/min)	FACTOR C (TEMPERATURA)	RESOLUCIÓN
1	0	0.8	25	5.55
2	0	0.8	25	5.62
3	31	0.8	25	15.61
4	31	0.8	25	15.67
5	0	1.4	25	7.9
6	0	1.4	25	7.62
7	31	1.4	25	12.66
8	31	1.4	25	12.63
9	0	0.8	35	6.34
10	0	0.8	35	6.24
11	31	0.8	35	14.64
12	31	0.8	35	14.68
13	0	1.4	35	8.18
14	0	1.4	35	8.18
15	31	1.4	35	9.94
16	31	1.4	35	10.24

Tabla 17. Diseño de experimento para LQM-996

EXP Y REPLICA	FACTOR A (% METANOL)	FACTOR B (VEL FLUJO mL/min)	FACTOR C (TEMPERATURA)	RESOLUCIÓN
1	0	0.8	25	5.66
2	0	0.8	25	5.5
3	31	0.8	25	13.69
4	31	0.8	25	14.07
5	0	1.4	25	7.76
6	0	1.4	25	7.38
7	31	1.4	25	11.85
8	31	1.4	25	12.03
9	0	0.8	35	4.13
10	0	0.8	35	5.85
11	31	0.8	35	13.05
12	31	0.8	35	12.93
13	0	1.4	35	7.4
14	0	1.4	35	7.38
15	31	1.4	35	9.24
16	31	1.4	35	8.61

La H_0 para ambos compuestos: $X_{efecto A} = X_{efecto B} = X_{efecto C} = X_{efecto AB} = X_{efecto AC} = X_{efecto BC} = X_{efecto ABC}$

La H_1 para ambos compuestos: al menos uno es diferente

Design-Expert® Software

RESOLUCIÓN



X1 = A: METANOL
X2 = B: Flujo

Actual Factor
C: Temperatura = 30.00

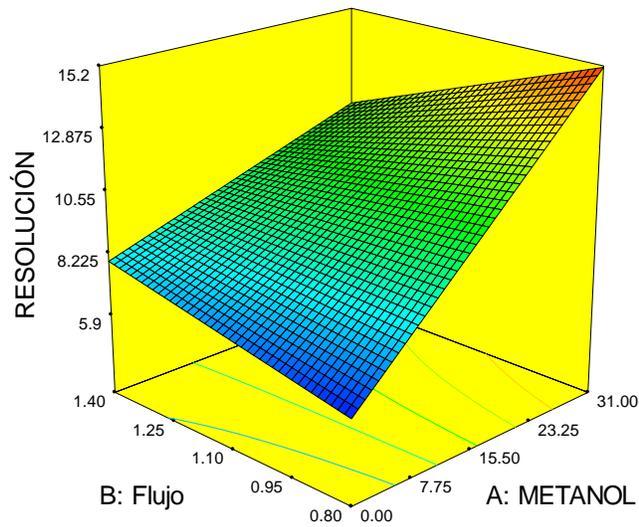


Figura 6. Gráfica de superficie de respuesta de los experimentos con el compuesto LQM-919

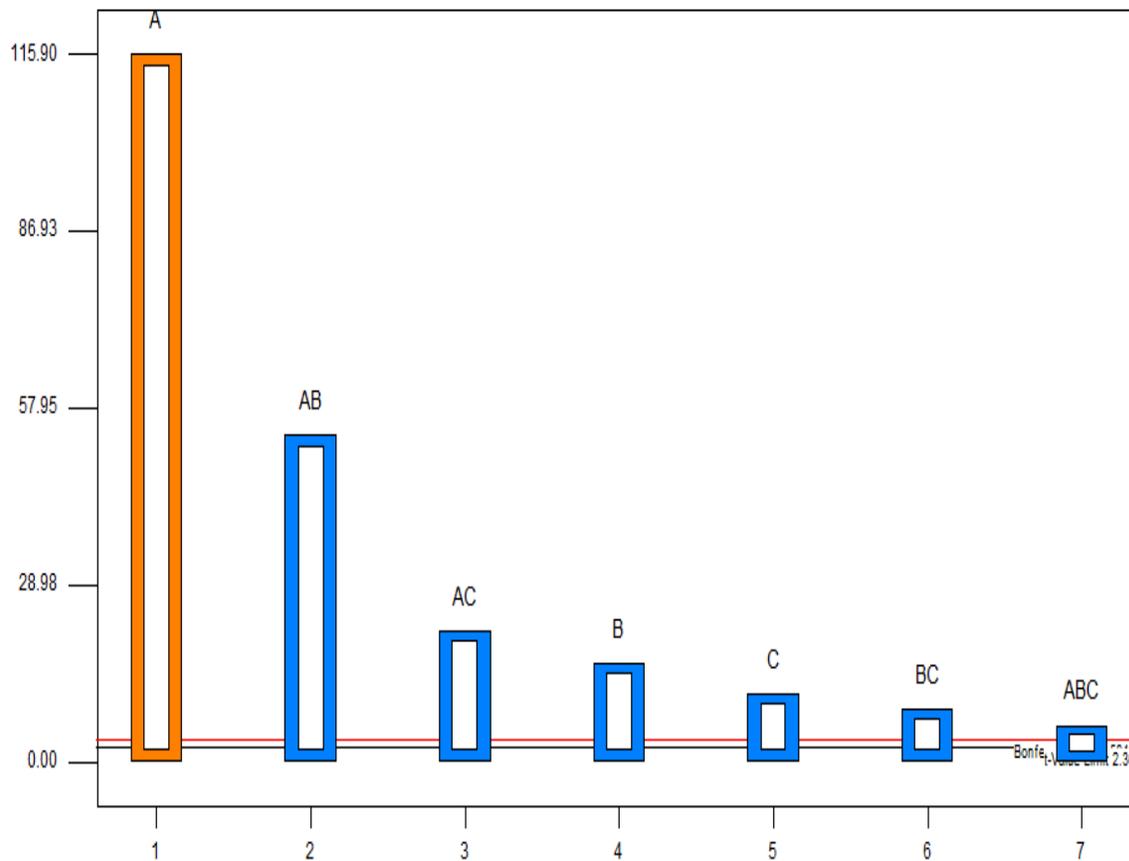


Figura 7. Gráfico de Pareto para el compuesto LQM-919

En la figura 6 y 7 se muestra el comportamiento de los experimentos realizados al variar la temperatura, proporción de disolvente y la velocidad de flujo, se puede observar que los efectos principales son significativos, así como las interacciones. El comportamiento con el compuesto LQM-996 resultó muy semejante. Y debido a que en todos los experimentos la resolución es superior a 2, se tomó en cuenta el número de platos teóricos para seleccionar las condiciones adecuadas de análisis, observando mayor eficiencia al utilizar la mezcla con los tres disolventes. Por lo tanto, se eligen condiciones de análisis que aportan mayor resolución y mayor número de platos teóricos, esto para garantizar que al emplear alta concentración del fármaco se logren detectar las impurezas que tenga adyacentes a su respuesta.

Con la columna Symmetry se consideró adecuado emplear: flujo de 0.8ml/min, temperatura de 35°C y la proporción de fase móvil 31:38:31 Metanol:Agua:Acetonitrilo. Siendo las diferentes proporciones de disolventes el factor que provoca un mayor efecto en la respuesta investigada.

Debido a que la columna Symmetry C18 presentó fallas, se buscó otra fase estacionaria con características semejantes que permitiera usar casi las mismas condiciones obtenidas con el diseño de experimentos inicial, con los experimentos probados se obtenía resolución elevada por arriba de 3, así que para hacer más rápido el análisis con la nueva columna, se incrementó la velocidad de flujo, manteniéndose adecuados la resolución y platos teóricos. A continuación se muestran los resultados obtenidos con la columna Phenomenex Kinetex, que es con la que se realizaron la mayoría de las pruebas de validación parcial para garantizar la confiabilidad de los resultados.

Adecuabilidad del sistema.

Tabla 18. Adecuabilidad de p-bromofenil carbamato de etilo con p-Bromoanilina

PARAMETROS	p-BROMOANILINA	p-BROMOFENILCARBAMATO DE ETILO
Área(CV)	0.63	0.69
Tiempo de Retención (CV)	0.07	0.11
Platos Teóricos	13164	13872
Resolución (cuando aplica)	-	15.31
Factor de coleo	1.66	1.14

Tabla 19. Adecuabilidad de p-clorofenil carbamato de etilo con p-Cloroanilina

PARAMETROS	p-CLOROANILINA	p-CLOROFENILCARBAMATO DE ETILO
Área(CV)	1.71	0.47
Tiempo de Retención (CV)	0.04	0.08
Platos Teóricos	12905	13467
Resolución (cuando aplica)	-	14.04
Factor de coleo	1.43	1.16

Las pruebas de adecuabilidad y precisión tienen como finalidad verificar que el sistema a utilizar para la validación funciona correctamente, con respecto a los criterios previamente determinados. Este parámetro permite establecer la confiabilidad del sistema antes de procesar las muestras. Se determinó a través de la inyección del estándar por sextuplicado de la solución al 0.10% con respecto a la concentración de los analitos principales p-clorofenil carbamato de etilo y p-bromofenilcarbamato de etilo. (Tablas 18 y 19). Cada una de las pruebas realizadas de adecuabilidad para cada pico cumplió con los criterios señalados, el coeficiente de variación (CV) fue menor al 2% en tiempos y áreas, así como el coleo que es alrededor de 1.5. En el caso de la precisión del sistema el CV se encontró por abajo del 2.0% también (Tabla 20).

Precisión del sistema (repetibilidad)

Tabla 20. Precisión de sistema de p-bromoanilina y p-cloroanilona

Muestra	p-BROMOFENIL CARBAMATO DE ETILO	P-CLOROFENILCARBAMATO DE ETILO
1	36159	37178
2	36499	37049
3	36101	37237
4	36366	37043
5	36509	36949
6	36395	36874
Promedio	36338	37055
CV (%)	0.47	0.37

Linealidad del sistema

La linealidad de un procedimiento analítico es su habilidad para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un rango específico, en este caso el punto central fue la concentración que equivale al porcentaje máximo para únicamente reportar la presencia de determinada impureza indicando únicamente el tiempo de retención en la cual se obtiene, y su presencia no implica un riesgo para la salud de la población en general (ICH Q3A, 2006) (Tabla 21 y 22)(Figura 8 y 9).

Tabla 21. Datos de curva de calibración de p-bromofenilcarbamato de etilo (LQM-919)

Nivel (%)	Concentración (µg/mL)	Respuesta
25	0.5	10252
	0.5	10192
	0.5	10234
50	1.0	17281
	1.0	17253
	1.0	17026
100	2.0	36499
	2.0	36159
	2.0	36101
150	3.0	56527
	3.0	56437
	3.0	56447
200	4.0	77450
	4.0	77791
	4.0	77763

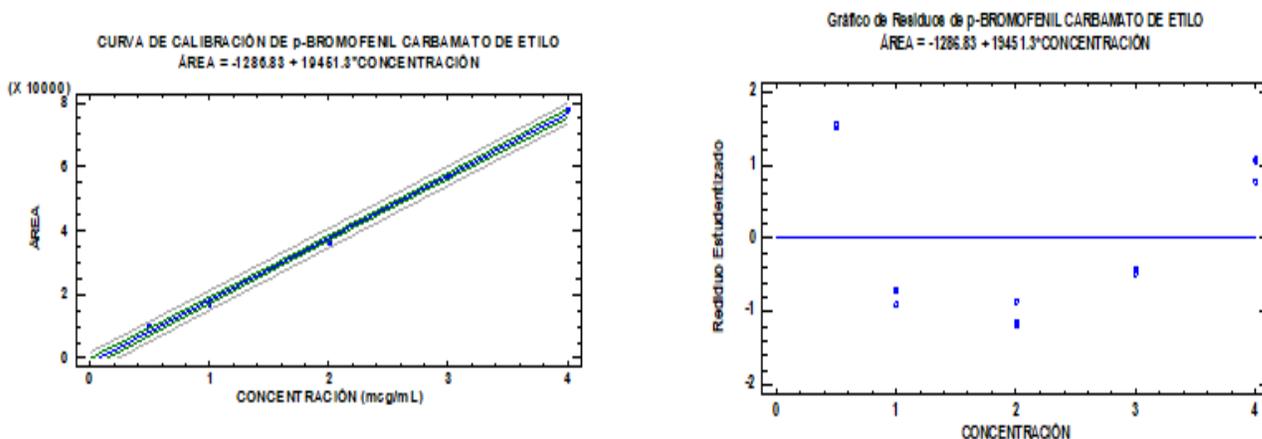


Figura 8. Curva de calibración y grafico de residuales de p-bromofenil carbamato de etilo

Tabla 22. Datos de curva de calibración de p-clorofenilcarbamato de etilo (LQM-996)

Nivel (%)	Concentración (µg/mL)	Respuesta
25	0.5	12924
	0.5	12718
	0.5	12652
50	1.0	22685
	1.0	22868
	1.0	22763
100	2.0	46237
	2.0	46466
	2.0	46385
150	3.0	69306
	3.0	69259
	3.0	69217
200	4.0	97571
	4.0	97906
	4.0	97111

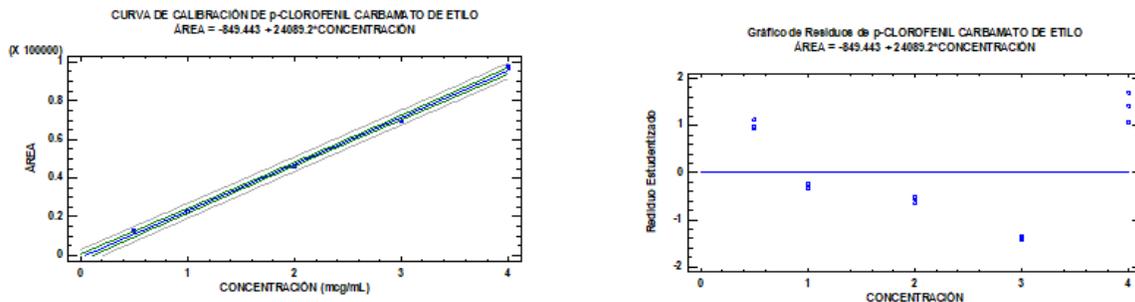


Figura 9. Curva de calibración y grafico de residuales de p-clorofenil carbamato de etilo

Como se puede observar en la tabla No. 23 el intervalo de confianza para el intercepto incluye al cero y el intervalo de confianza para la pendiente no incluye al cero.

Además, para demostrar que existe una relación lineal entre las variables en estudio se realizó un análisis de varianza y se estableció la siguiente hipótesis:

H₀: No existe una relación lineal entre la concentración y el área.

H_i: Existe una relación lineal entre la concentración y el área.

Criterio de aceptación:

Si $F_{cal} < F_{crítica}$ no se rechaza H₀.

Si $F_{cal} > F_{crítica}$ se rechaza H₀.

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza y la hipótesis establecida, observamos que el valor de la Fcal es mucho mayor que la Fcrítica por lo que se rechaza H₀ por lo que existe una relación lineal

entre la concentración y el área con un nivel de confianza del 95%; lo que significa que el área medida es debida a la variación de la concentración de p-Bromofenil carbamato de etilo y p-Clorofenil carbamato de etilo respectivamente.

Tabla 23. Resultados de los parámetros de linealidad para los compuestos p-bromofenil carbamato de etilo y p-clorofenil carbamato de etilo.

PARÁMETRO	p-Bromofenil carbamato de etilo	p-Clorofenil carbamato de etilo
Intercepto (β_0)	-1286.83 IC β_0 =(-2720.06-146.41) Error típico: 663.42	-849.44 IC β_0 =(-2668.67 a 969.79) Error típico: 842.092904
ANOVA	F=5200.80, valor $p < 0.05$ (relación lineal significativa entre área y concentración al 95% de confianza)	F=4950.85, valor $p < 0.05$ (relación lineal significativa entre área y concentración al 95% de confianza)
Pendiente (β_1)	19451.25 (18868.56-20033.94) Error típico: 269.72	24089.19 IC β_1 =(23349.57 a 24828.82) Error típico: 342.35945
Coefficiente de determinación (r^2)	0.9975 Error típico: 1337.76512	0.9972 Error típico: 1698.04765

Especificidad del método

Para la prueba de especificidad se empleo el sistema PDA (Detector de arreglo de diodos) del equipo para evaluar la pureza de la respuesta obtenida, observando que los picos principales de activos e impurezas presentaron pureza espectral, por lo tanto, el tiempo de retención de los compuestos es específico para las sustancias investigadas (Tabla 24).

En el caso del diluyente aun cuando presenta algunos picos de respuesta, estos no interfieren con la respuesta de las impurezas o carbamatos (Figura 10).

En las figuras 11 y 12 se muestran los cromatogramas de la solución de adecuabilidad preparada con p-bromofenil carbamato de etilo y p-bromoanilina y a parte, la solución de p-clorofenil carbamato de etilo con p-cloroanilina en ambos casos se observa entre cada uno de los analitos y su materia prima de origen una señal adicional que se repite en las tres inyecciones efectuadas por lo que también se registra su tiempo de retención y pureza. Coincidiendo con el tiempo de retención que se encontró en las soluciones preparadas de los estándares de materias primas p-cloroanilina y p-bromoanilina, y además presentaron diferente tiempo de retención en cada caso; es decir, p-bromoanilina presenta una impureza en un tiempo de retención de 1.39 min y p-cloroanilina en un tiempo de 1.26 min, por lo tanto, son compuestos diferentes pero específicos para cada caso. Este dato es importante porque dichas respuestas se dieron principalmente en los análisis de muestras sin purificar (Figuras 13 y 14).

Tabla 24. Pureza de pico en los sistemas analizados con el software Empower 3

COMPUESTO	TR	TRR	Angulo de pureza	Angulo de ruido	Resultado
Diluyente	S/R S/R S/R	S/R S/R S/R	S/R S/R S/R	S/R S/R S/R	Cumple
p-Bromoanilina (PBrA)	1.058 1.058 1.060	0.589	24.959 25.162 24.981	83.947 71.689 67.407	Cumple
Imp a partir de PBrA	1.393 1.390 1.395	0.775	58.192 51.444 55.213	90.000 90.000 90.000	Cumple
p-Bromofenilcarbamato de etilo	1.797 1.797 1.800	1	17.852 19.075 19.003	41.981 44.491 42.135	Cumple
p-Cloroanilina (PCIA)	0.979 0.980 0.979	0.608	21.486 20.143 20.689	54.959 49.362 46.737	Cumple
Imp a partir de PCIA	1.265 1.267 1.265	0.786	48.286 46.460 50.338	90.000 90.000 90.000	Cumple
p-Clorofenil carbamato de etilo	1.611 1.612 1.610	1	20.291 20.970 22.445	53.014 51.281 49.868	Cumple

Nota: A partir de cromatogramas de adecuabilidad. TR=Tiempo de retención. TRR=Tiempo de retención relativo con respecto al carbamato respectivo. S/R=Sin respuesta. Lectura a 242nm.

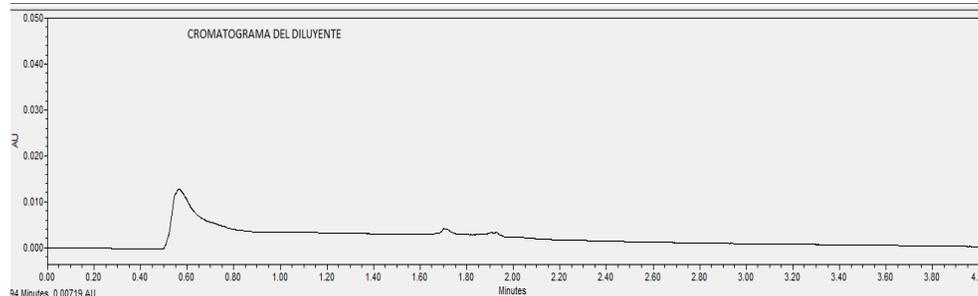


Figura 10. Cromatograma de metanol a 242 nm.

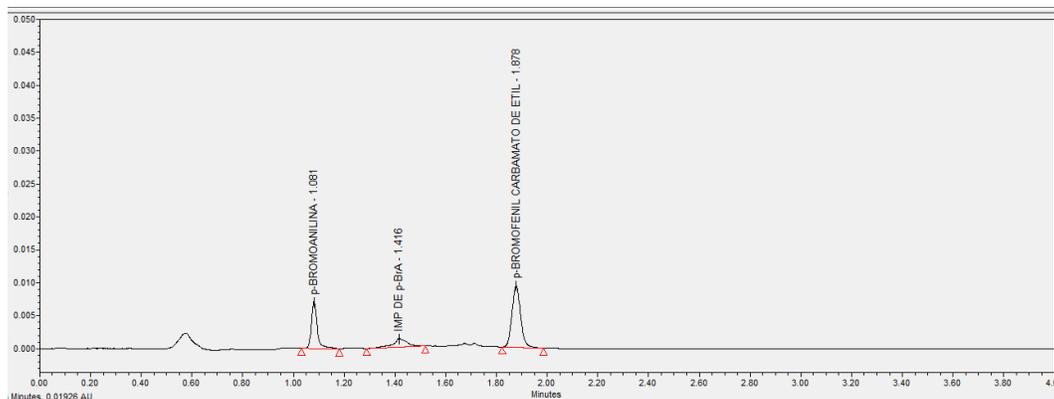


Figura 11. Cromatograma de estándares de p-bromoanilina y p-bromofenilcabamato de etilo a 1 µg/mL cada uno en metanol y lectura a 242 nm.

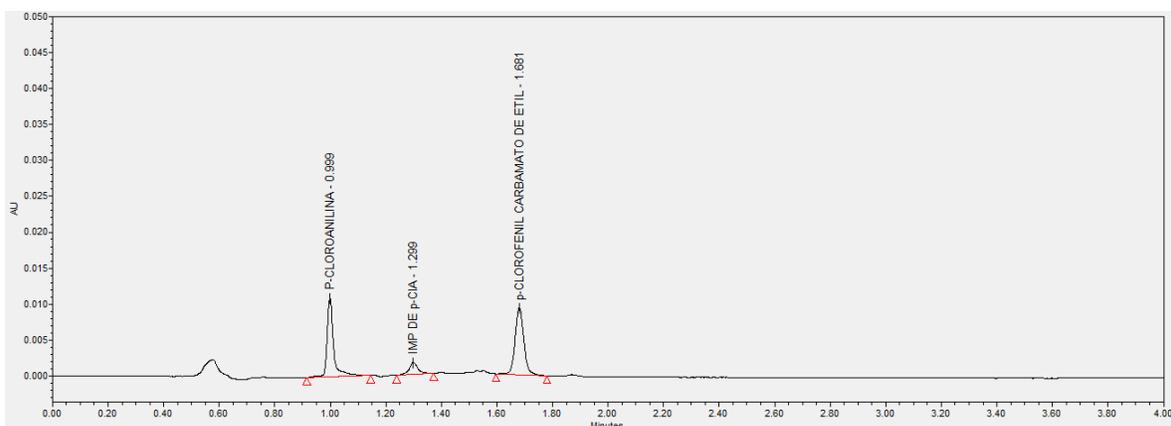


Figura 12. Cromatograma de estándares de p-bromoanilina y p-bromofenilcabamato de etilo a 1 µg/mL cada uno en metanol y lectura a 242 nm.

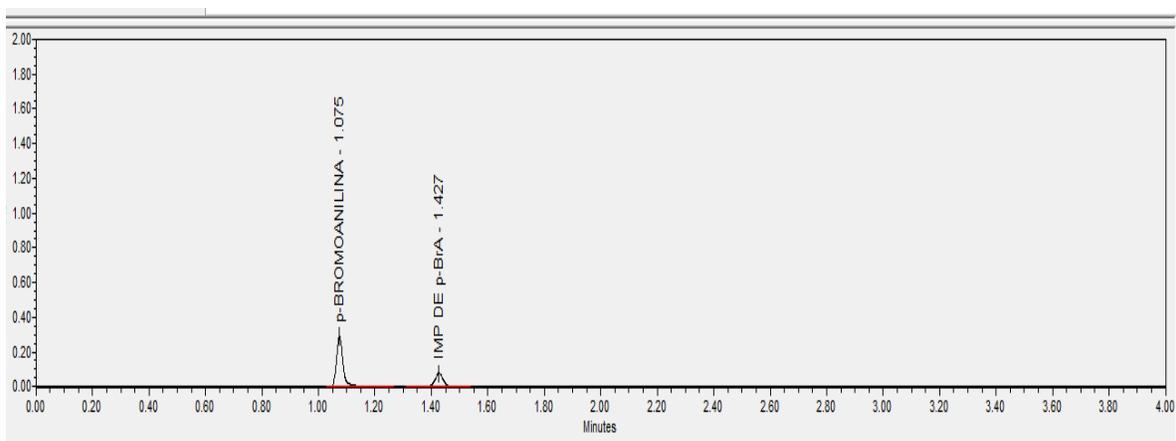


Figura 13. Cromatograma de estándar de p-bromoanilina a 40 µg/mL en metanol y lectura a 242 nm.

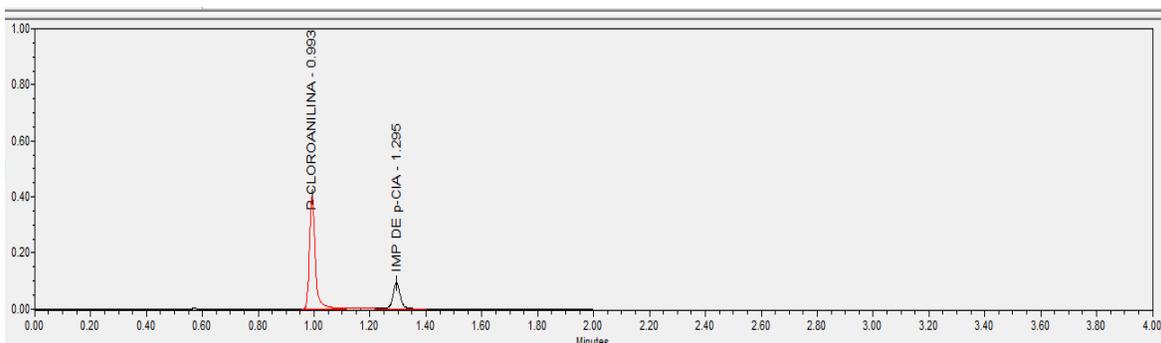


Figura 14. Cromatograma de estándar de p-cloroanilina a 40 µg/mL en metanol y lectura a 242 nm.

Como se mencionó en la metodología de la síntesis de LQM-919 y LQM-996, las anilinas empleadas reaccionan rápidamente en presencia de luz y calor, de ahí las precauciones al usar estos reactivos. Es probable que la impureza proveniente de las anilinas sea 4-cloronitrobenzenu o 4-bromonitrobenzenu o sea a partir de 4-cloroanilina o 4-bromoanilina respectivamente (Figura 15).

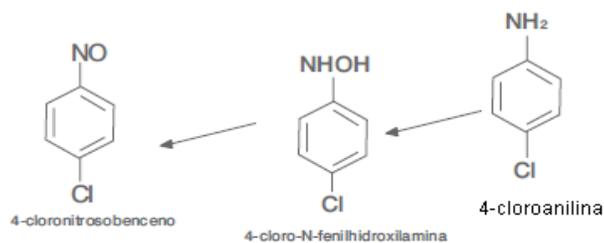


Figura 15. Ejemplo de productos de degradación de p-cloroanilina por reacción fotolítica directa.

Para comprobar que los carbamatos sintetizados y las referencias se tratan del mismo compuesto se agregó una gota de la referencia a la muestra para observar el incremento de área (Figura 16 y 17).

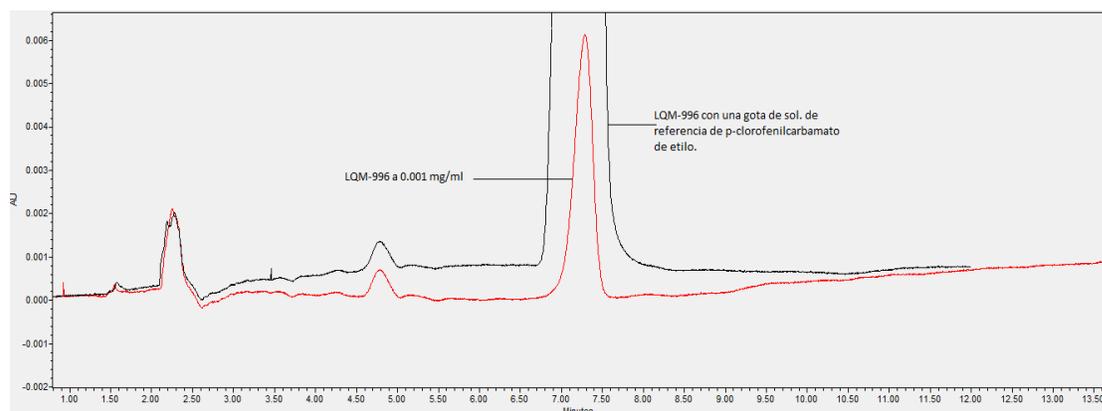


Figura 16. Cromatograma de LQM-996 a 1 µg/mL recristalizado y superpuesto cromatograma de LQM-996 misma muestra, pero con adición de una gota de la solución de referencia.

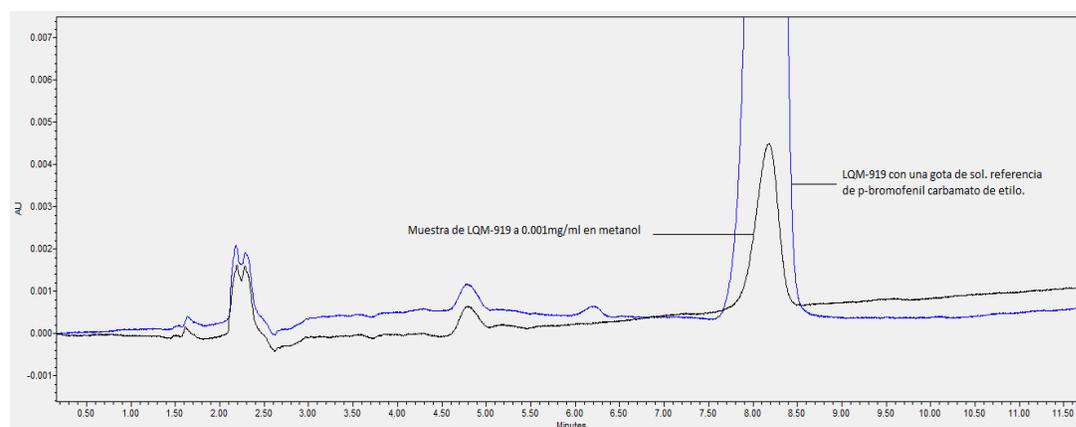


Figura 17. Cromatograma de LQM-919 a 1 µg/mL recristalizado y superpuesto cromatograma de LQM-996 misma muestra, pero con adición de una gota de la solución de referencia.

Límite de detección y límite de cuantificación.

Los resultados obtenidos para el límite de detección y cuantificación fueron adecuados para garantizar que se logra la determinación confiable a los niveles de impurezas permitidos (Tabla 25).

Tabla 25. Límite de detección y cuantificación de p-bromofenilcarbamato de etilo y p-clorofenilcarbamato de etilo.

LÍMITE DE	p-Bromofenil carbamato de etilo	p-Clorofenil carbamato de etilo	Criterio de aceptación
DETECCIÓN	0.10 µg/mL	0.10 µg/mL	≤ 1 µg/mL*
CUANTIFICACIÓN	0.34 µg/mL	0.35 µg/mL	≤ 1 µg/mL*

*Límite de reporte (0.1%) para cuando se trabaja con una solución concentrada de analito a 1000 µg/mL.

Exactitud del método

Tabla 26. Recobro del sistema a 100% de p-bromofenilcarbamato de etilo

Muestra	Área de STD	Área de muestra (LQM-919)	Concentración recuperada (µg/mL)	Recobro (%)
1	36159	37965	2.10	104.99
2	36499	38081	2.09	104.33
3	36101	38171	2.11	105.73
4	36366	38056	2.09	104.65
5	36509	38180	2.09	104.58
6	36395	37878	2.08	104.07
Promedio aritmético	36338	38055	2.09	104.73
CV (%)	0.47	0.31	0.56	0.56

Tabla 27. Recobro del sistema al 100% de p-clorofenilcarbamato de etilo.

Muestra	Área de STD	Área de muestra (LQM-996)	Concentración recuperada (µg/mL)	Recobro (%)
1	37178	37849	1.96	98.23
2	37049	37715	1.96	98.23
3	37237	37884	1.97	98.29
4	37043	37865	1.96	97.83
5	36949	37785	1.96	97.79
6	36874	37888	1.95	97.32
Promedio aritmético	37055	37831	1.96	97.95
CV (%)	0.37	0.18	0.38	0.38

Al realizar la evaluación de los porcentajes de recobro, se muestra que no hay una diferencia significativa entre los recobros obtenidos con los estándares de referencia de p-clorofenil carbamato de etilo y p-bromo fenil carbamato de etilo con respecto a los carbamatos sintetizados en el laboratorio LQM-996 y LQM-919 respectivamente. Los datos obtenidos indican que el método cumple con los criterios de aceptación (Tabla 26 y tabla 27).

Una vez que se observó que el método cumple con los criterios mínimos de validación se realizó el análisis de las muestras de síntesis impuras y una vez purificadas con diferentes disolventes. Como se escribió en la tabla 15, el rendimiento fue superior al 90% en todas las muestras sintetizadas. Y los análisis por HPLC mostraron también alta pureza en las distintas etapas de obtención del producto.

En el caso de las diferentes muestras analizadas del compuesto LQM-919, es decir, como crudo justo después de la síntesis, después de que se baja con hexano y cuando se vuelve a disolver con acetona y se agrega carbón activado el porcentaje de impurezas individuales resultó inferior al 0.20% y en algunos caso menor a 0.10%, las que se encontraron entre 0.10% y 0.20% es necesario informarlas con el tiempo de retención, y las que son menores al 0.10% no requieren informarse. Con las diferentes recristalizaciones las impurezas disminuyeron, pero el tiempo de retención relativo 3 (TRR3) coincide con el tiempo de retención (TR) del carbamato LQM-996, que podría tratarse de contaminación cruzada del análisis o también posibles trazas de p-cloroanilina que se encuentre presente en la materia prima p-bromoanilina utilizada en la síntesis. En la muestra que se recristalizó con acetato de etilo y gotas de hexano se obtuvo un porcentaje de la impureza antes mencionada de 0.26%; es decir, se encuentra por arriba del nivel de informe y de acuerdo con a la VICH GL10 es necesaria la identificación estructural inequívoca.

Tabla 28. Porcentaje de área de impurezas y principio activo en las diferentes etapas de síntesis y purificación para LQM-919 (promedio de 3 réplicas)

Después de síntesis	TRR1=0.503	TRR2=0.581 (p-BrA)	TRR3=0.766 (Imp de pBrA)	TRR4=0.899	TRR5=1.000 (pBrFCE)
Crudo	0.04	0.02	0.14	0.03	99.77
B-Hexano	0.02	0.02	0.13	0.03	99.8
C+ Acetona	0.06		0.15	0.04	99.76
RECRISTALIZACIÓN		TRR1=0.564 (p-BrA)	TRR2=0.766 (Imp de pBrA)	TRR3=0.899	TRR4=1.000 (pBrFCE)
Etanol : agua 50:50	-	0.01	0.04	0.08	99.87
Acetato gotas hex	-	-	-	0.26	99.74
Acetona	-	-	-	0.06	99.94

En la tabla 29 se muestran los tiempos de retención relativos del carbamato LQM-996 y sus impurezas encontradas en las diferentes etapas de purificación, el crudo, la muestra bajada con hexano y la muestra después de mezclarse con carbón activado y pasarse por tierras de diatomeas. Se observó

elevada pureza, pero a diferencia del carbamato LQM-919, los análisis de muestras impuras del LQM-996 arrojaron porcentajes superiores al 0.50% que, si se hubiera tratado de la muestra purificada, la calificación sería imprescindible por normatividad (VICH GL10. 2008). Para mostrar que las impurezas con TRR2 y TRR3, con respecto al p-clorofenil carbamato de etilo pertenecen a la materia prima p-cloroanilina se agregó una gota de la referencia a una muestra impura (crudo), observando el crecimiento del pico de p-cloroanilina (Figura 18).

El carbamato LQM-996 también se purifico con diferentes disolventes, presentando en los tres casos un porcentaje de impurezas inferior al 0.10%; es decir, no sería necesario su reporte. Cabe mencionar, que, al realizar la purificación con los distintos disolventes, variaba la cristalinidad, y se sospechaba que se debía a distintas impurezas en cada caso o a diferente porcentaje de impurezas. Como el porcentaje de impurezas se encontró por debajo del límite de reporte, se descarta que haya diferencia al emplear etanol: agua 50:50, acetato de etilo con gotas de hexano o acetona únicamente. Para disminuir la presencia de solventes residuales peligrosos se sugiere la recrystalización con etanol: agua 50:50, pero por porcentaje de impurezas los tres son indistintos (VICH GL10, 2008).

Tabla 29. Porcentaje de área de impurezas y principio activo en las diferentes etapas de síntesis y purificación para LQM-996 (promedio de 3 réplicas).

Después de síntesis	TRR1=0.566	TRR2=0.599 (p-CIA)	TRR3=0.782 (Imp de pCIA)	TRR4=1.000 (pCIFCE)		
Crudo	-	8.26	0.61	91.13	-	-
B-Hexano	0.01	8.74	0.64	90.60	-	-
C+ Acetona	-	8.08	0.68	91.28	-	-
RECRISTALIZACIÓN	TRR1=0.566	TRR2=0.599 (p-CIA)	TRR3=0.665 (p-BrA)	TRR4=0.782 (Imp de pCIA)	TRR5=1.000 (pCIFCE)	TRR6=1.114
Etanol:agua 50:50	-	0.02	-	0.04	99.89	0.05
Acetato gotas hex	0.03	-	0.2	0.08	99.7	-
Acetona	-	-	0.07	0.02	99.91	-

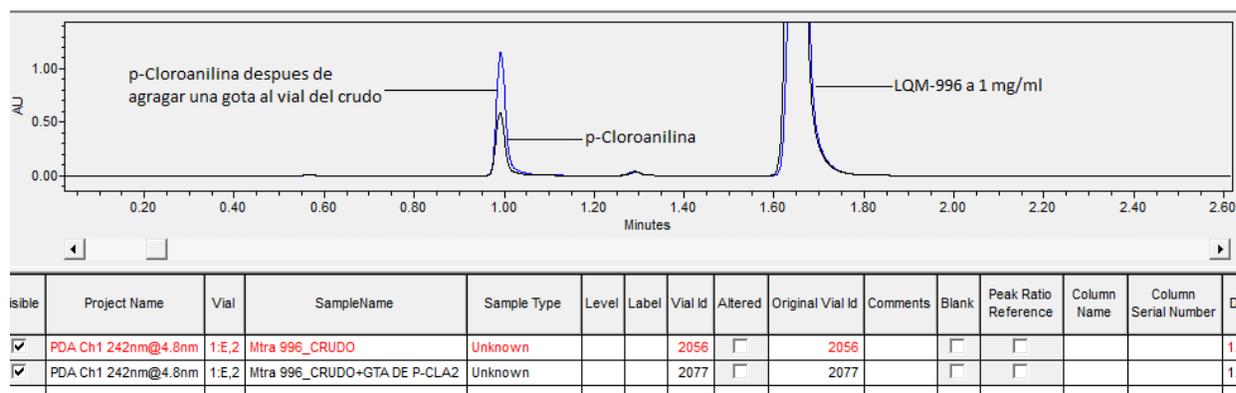


Figura 18. Cromatograma de solución de muestra de crudo LQM-996 que presenta un pico desconocido, se superpone otro cromatograma de la misma muestra a la que se agregó una gota de referencia de p-cloroanilina.

La observación de presencia de las materias primas como impureza se da desde la síntesis al realizar las placas cromatográficas para seguir la reacción, en todo momento se detecta la presencia de p-cloroanilina o p-bromoanilina en la síntesis de LQM-996 o LQM-919 respectivamente (Figura 19).

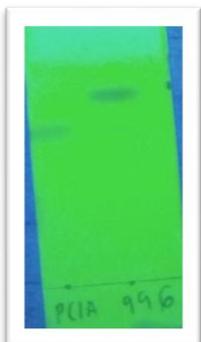


Figura 19. Ejemplo de placa fina para seguir la reacción de LQM-996

7. ANÁLISIS DE AVANCES DE INVESTIGACIÓN

Como se ha mencionado una de las principales razones para el análisis de impurezas de fármacos de uso humano y animal es el estar utilizando sustancias seguras cuyos efectos tóxicos están controlados o sean inexistentes. Otro aspecto importante y que va de la mano con la seguridad en el manejo de sustancias químicas es el respeto al medio ambiente, garantizar que los fármacos que se administran los animales de consumo no son tóxicos para ellos ni para el medio que los rodea.

Los carbamatos son moléculas que se han usado ampliamente dentro de la agricultura y producción animal para el control de plagas como son la infestación por garrapatas, son moléculas que se tienen en la mira por su mecanismo de acción semejante al de los organofosforados; es decir, inhibición de la acetilcolinesterasa en la mayoría de los casos. El mecanismo de acción de los carbamatos LQM-919 y LQM-996 es sobre la reproducción de las garrapatas, teniendo efecto casi nulo sobre la acetilcolinesterasa (Prado Ochoa, 2014).

La investigación realizada arrojó como resultado que durante las etapas previas a la recristalización las principales impurezas de los carbamatos LQM-919 y LQM-996 son las anilinas de origen; p-bromoanilina y p-cloroanilina o sus productos de degradación. Que aunque los carbamatos investigados son estables y presentan una baja toxicidad, se ha reportado en la literatura que las anilinas son tóxicas y pueden tener efectos carcinogénicos sobre los humanos (Balaji, et al, 2006) el control de los niveles de impurezas en los carbamatos es muy importante para garantizar la baja toxicidad de ellos y para cumplir con la normatividad cada vez más estricta sobre el uso de los fármacos en animales (VICH G10, 2006)(ICH-M7, 2017).

Con los datos obtenidos de las muestras recristalizadas se encontró que los niveles de impurezas desconocidas en su mayoría están por debajo de los niveles de reporte ($\leq 0.10\%$) y en uno de los casos se aproxima al nivel de identificación (0.20%) (VICH GL10, 2006), se observó que la muestra recristalizada LQM-919 con acetato de etilo y gotas de hexano presentó una respuesta de 0.26% , es

decir, por arriba del nivel de identificación, como se mencionó es probable que haya sido contaminación al analizar, debido a que ese porcentaje fue mucho menor en la muestra sin purificar. De acuerdo a los tiempos de retención la impureza se trataba del p-clorofenil carbamato de etilo probablemente por el uso de alta concentración (1000 µg/mL) se presentó arrastre a la siguiente inyección, por lo que es importante realizar un lavado previo y al final de la jeringa, para evitar esta contaminación.

Con las pruebas realizadas hasta el momento se puede decir que el método es específico y permite determinar de forma confiable las impurezas relacionadas provenientes de la síntesis.

8. CONCLUSIONES

Se logró la síntesis y purificación de los compuestos p-clorofenil carbamato de etilo (LQM-996) y p-bromofenil carbamato de etilo (LQM-919).

Se adecuó un método isocrático por HPLC cuyas condiciones de análisis fueron: Fase móvil: Metanol:agua:acetonitrilo 31:38:31, con velocidad de flujo igual a 1.5 mL/min, temperatura del horno de 35°C y volumen de inyección de 5µL.

Se logro determinar que las materias primas de origen p-cloroanilina y p-bromoanilina o sus productos de degradación respectivos son las principales impurezas presentes en los compuestos LQM-919 y LQM-996. Y la purificación a través de la recristalización con cualquiera de los diferentes disolventes es muy efectiva para lograr niveles de impurezas que se encontraron por debajo del límite de reporte (0.10%); es decir, de acuerdo a los niveles indicados en la guía VICH GL 10 para fármaco de uso veterinario los carbamatos sintetizados y purificados en el laboratorio de química medicinal son seguros.

9. PERSPECTIVAS

- Completar la validación con la prueba de precisión intermedia, exactitud del método y especificidad para detectar productos de degradación.
- Para tener una alternativa al método por HPLC, sería importante lograr la determinación de impurezas también por electroforesis capilar.

10. REFERENCIAS

- Alonso Díaz, M., Rodríguez-Vivas, R. I., Fragoso-Sánchez, H. & Rosario-Cruz, R. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Archivos Medicina Veterinaria*, 38(2), pp. 105-113.
- Auja, S., Mills, A.K. (2003). Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceuticals. Ed. Academic Press. Elsevier Science. USA. pp 1-399.
- Balaji V, Chandra S, Goswami DA, Das SK, Mandal TK, Chakraborty AK, et al.(2006). Toxicokinetics, metabolism, and microsomal studies of chlorpropham in rats. *Toxicologie Environ Chem*; 88: pp 527–39.
- Benavides, O.E., Romero, P.J., Villamil, J.L.C. (2016). Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedades que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático: Guía para el manejo de garrapatas y su adaptación al cambio climático. *Universidad La Salle Instituto Interamericano para la Agricultura (IICA)*. San José, Costa Rica. pp 1-98
- DeRuiter, J.(2005). Amides and related functional groups . En: *Principles of Drug Action*. pp 1-14.
- Domínguez-García, D. I., et al.(2010). *Boophilus microplus*: Aspectos biológicos y moléculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal.. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, Issue 12, pp. 181-192.
- Eraso Guerrero, E. G. & Quenguan Cuaran, F. E.(2015). *Determinación de plaguicidas organofosforados y carbamatos en agua para consumo humano del departamento de Nariño mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC-VWD)*. Nariño, Colombia: Universidad de Nariño.
- Esquivel González, S.(2016). *Determinación espectrofotométrica (UV-VIS) de la(s) constante(s) de acidez del compuesto (4-bromofenil)carbamato de etilo*. México: TESIS-UNAM.
- García de Llasera, M. & Bernal-González, M., (2001). Presence of carbamate pesticides in environmental waters from the northwest of Mexico: Determination by liquid chromatography. *Pergamon-Elsevier Science*, 35(8), pp. 1933-1940.
- García, M. A., et al. (2002). *Guía de validación de métodos analíticos*: México: Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.
- Gosling, P. J. (2005). *Dictionary of parasitology*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Gou, Y., Eisert, R. & Pawliszyn, J. (2000). Automated in-tube solid-phase microextraction–high-performance liquid chromatography for carbamate pesticide analysis. *Journal of Chromatography A*, Marzo, 873(1), pp. 137-147.
- Guillarme, D., Nguyen, D., Rudaz, S. & Veuthey, J.-L. (2008). New trends in fast and high resolution chromatography: A critical comparison of existing approaches.. *European Journal of Pharmaceutical Biopharm.*, Volumen 68, pp. 430-1082.
- Herrera López, J. P.(2017). *Desarrollo de una nanosuspensión de un derivado de carbamatos (LQM-919) para el tratamiento de garrapatas en vacas*. México: UNAM-FES Cuautitlán.
- Holm, R. & Elder, D. P. (2016). Analytical advances in pharmaceutical impurity profiling. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volumen 87, pp. 118-135.
- ICH-Q2 (R1), I. C. o. H.(2005). *Validation of analytical procedures: Text and Methodology*.
- ICH-Q3A (R2), I. C. o. H.(2006). *Impurities in new drug substances*.
- ICH-Q3B (R2), I. C. o. H. (2006). *Impurities in new drug products*.
- ICH M7 (R1). (2017). Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk.
- Kushwah, D., Patel, H. B., Sinha, P. K. & Jana, P. K. (2011). Practical approach for the determination of response factors of impurities in drugs by HPLC. *E-Journal of chemistry*, 8(4), pp. 1504-1511.
- Lakshmana, P. S., Suriyaprakash, T.N.K. (2010). Impurities and its importance in pharmacy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. Volume 3 (2)*. pp 66-71.

Maggio, R. M., Calvo, N. L., Vignaduzzo, S. E. & Kaufman, T. S. (2014). Review: Pharmaceutical impurities and degradation products: Uses and applications of NMR techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24 Abril, Volumen 101, pp. 102-122.

Montiel Ayala, M. E. (2016). *Determinación espectrofotométrica (UV-VIS) de la(s) constante(s) de acidez del compuesto (4-clorofenil)carbamato de etilo*. México: TESIS-UNAM.

Ouertani, R., El Atrache, L. L. & Hamida, N. B. (2016). Chemometrically assisted optimization and validation of reversed phase liquid chromatography method for the analysis of carbamates pesticides. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, Issue 154, pp. 38-44.

Pérez-González, et al. (2014). Effect of new ethyl and methyl carbamates on "Rhipicephalus microplus" larvae and adult ticks resistant to conventional ixodicides. *Veterinary Parasitology*, Issue 199, pp. 235-241.

Prado-Ochoa, M. G. et al. (2014). Assessment of Acute Oral and Dermal Toxicity of 2 Ethyl-Carbamates with Activity against Rhipicephalus microplus in Rats. pp. 10.

Prado-Ochoa, M. G. et al. (2014). Subchronic Toxicity Study in Rats of Two New Ethyl-Carbamates with Ixodocidal Activity. *BioMed Research International*, pp. 12.

Prado-Ochoa, M. et al. (2013). Effect of new ethyl and methyl carbamates on biological parameters and reproduction of the cattle tick Rhipicephalus microplus. *Veterinary Parasitology*, Issue 194, pp. 49-57.

Prado-Ochoa, M. et al. (2014). The action of two ethyl carbamates on acetylcholinesterase and reproductive organs of "Rhipicephalus microplus". *Veterinary Parasitology*, Issue 3-4, pp. 215-224.

Riley, C. M., Rabel Riley, S. R. & Phelps, R. L.. (2014). *Specification of drug substances and products: Development and validation of analytical methods*.. Maryville, MO: ELSEVIER.

Rodríguez, D.(2005). *Analytical techniques for biopharmaceutical development*. USA: Marcel Dekker.

Rodríguez-Vivas, R. I., Hodgkinson, J. E. & Trees, A. J. (2012). Resistencia a los acaricidas en Rhipicephalus (Boophilus) microplus: situación actual y mecanismos de resistencia. *Revista Mexicana de Ciencias pecuarias*, Issue 3, pp. 9-24.

SAGARPA-SENASICA. (1994). *NOM-019-ZOO-1994: Campaña nacional contra la garrapata Boophilus*. s.l.:SAGARPA-SENASICA.

Schosinsky, K., Quintana Guzmán, E. M. & Ruepert, C. (2009). Optimización de un método para la detección de carbamatos y organofosforados en vegetales. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 1(43), pp. 11-20.

Smith, M. J. & Bucher, G. (2012). Tools to study the degradation and loss of the N -phenyl carbamate chlorpropham — A comprehensive review. *Environment International*, Issue 49, pp. 38-50.

Soto Chinchilla, J. J. (2007). *Nuevas aportaciones al análisis de residuos de plaguicidas y antibióticos en aguas y alimentos*. Granada: Universidad de Granada: Facultad de Ciencias.

Suzuki, O. & Watanabe, K. (2005). *Drugs and poisons in humans: A handbook of practical analysis*.. Tokyo: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

VICH-GL10. (2008). *Impurities in new veterinary drug substances*.