



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

**FÁRMACOS QUE PUEDEN PRESENTAR COMPUESTOS
N-NITROSOS COMO SUSTANCIAS CARCINOGENICAS:
UN ENFOQUE ESTRUCTURAL**

PRESENTA:

MARIANA ITZEL TORRES MALDONADO

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**



Ciudad Universitaria, CDMX, 2021



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: HERNÁNDEZ LUIS FRANCISCO

VOCAL: Profesor: GONZÁLEZ TRUJANO MARÍA EVA

SECRETARIO: Profesor: DEL VALLE PÉREZ PAULINA

1er. SUPLENTE: Profesor: ROA CORIA JOSÉ EDUARDO

2° SUPLENTE: Profesor: RAMÍREZ LÓPEZ ELENA GUADALUPE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

FACULTAD DE QUÍMICA, CIUDAD UNIVERSITARIA

ASESOR DEL TEMA:

HERNÁNDEZ LUIS FRANCISCO

SUSTENTANTE (S):

TORRES MALDONADO MARIANA ITZEL

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Formación de los compuestos <i>N</i> -nitrosos.....	2
Activación metabólica.....	5
Planteamiento del problema.....	7
Objetivos.....	7
Hipótesis.....	7
MATERIAL Y MÉTODO DE BÚSQUEDA.....	8
RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN.....	9
DISCUSIÓN.....	37
Clasificación de carcinogenicidad de acuerdo a la OMS.....	37
Carcinogénesis.....	37
Teratogénesis.....	38
Alteraciones enzimáticas y hormonales.....	39
Uso de nano puntos de carbón en ADN como metodología de detección.....	41
Productos farmacéuticos como precursores de reacción.....	41
Influencia de la estructura de los precursores.....	42
Papel del pH en la reacción de formación.....	43
Comparación entre monocloramina y dicloramina.....	45
Proceso de nitrosación.....	46
Cálculo de ingesta aceptable basada en la evaluación de riesgo... ..	47
Ranitidina.....	54
Metformina.....	55
Rutas alternas de contaminación.....	55
Acciones de regulación nacional.....	57
CONCLUSIONES.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59
APÉNDICE.....	65
Tabla 10. Estructuras de los Ingredientes Activos Farmacéuticos que han mostrado ser capaces de producir nitrosaminas con distintos rendimientos.....	65
Tabla 11. Estructuras de las principales impurezas de <i>N</i> -nitrosaminas con sus respectivos precursores y su fuente probable.....	71
Tabla 12. Estructuras que podrían ser capaces de producir nitrosaminas de acuerdo a su estructura.....	72

ABREVIATURAS

ALT. Alanina aminotransferasa

API. Ingrediente activo farmacéutico

AST. Aspartato aminotransferasa

BMDL. Dosis Benchmark (límite inferior de confianza)

BUN. Nitrógeno ureico en sangre

CEP. Certificado de idoneidad/aptitud

CHMP. Comité de medicamentos de uso humano

COFEPRIS. Comisión federal para la protección contra riesgos sanitarios

CPDB. Base de datos de la potencia carcinogénica

DEA. Dietilamina

DEET. *N,N*-Dietil-meta-toluamida

DEN. Dietilnitrosamina

DL₅₀. Dosis letal 50

DMA. Dimetilamina

DMBzA. *N, N*-dimetilbenzilamina

DMF. Dimetilformamida

DMiPA. *N, N*-dimetilisopropilamina

DPN. *N, N*-difetilnitrosamina

EDG. Grupo donador de electrones

EDQM. Dirección europea para la calidad de los medicamentos y la atención sanitaria

EMA. Agencia europea de medicamentos

EWG. Grupo que retira electrones

FDA. Administración de medicamentos y alimentos

FP. Potencial de formación

FRAP. Potencial reductor/antioxidante férrico

GMP. Buenas prácticas de fabricación

GPx. Glutación peroxidasa

GST. Glutación-S-transferasa
GSH. Glutación
IARC. Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
ICH. Consejo internacional de armonización
LoQ. Límite de cuantificación
MDA. Malondialdehído
MEN. *N*-metilnitrosamia
MFP. Potencial de formación modificado
NDBA. *N*-dibutilnitrosamina
NDEA. *N, N*-dietilnitrosamina
NDELA. *N*-dietanolnitrosamina
NDMA. *N, N*-dimetilnitrosamina
NMEA. *N*-metiletilnitrosamina
NMOR. *N*-nitrosomorfolina
NPIP. *N*-nitrosopiperidinitrosa
NPYR. *N*-nitrosopirrolidina
NSAR. *N*-nitrososarcosina
OMCL. Laboratorios oficiales de control de medicamentos
OMS. Organización Mundial de la Salud
OTC. Medicamentos de libre venta
SDS. Sistema de distribución simulada
SGOT. Transaminasa glutámico-oxalacética sérica
SGPT. Transaminasa glutámico-pirúvica sérica
TD₅₀. Dosis tumorigénica 50
TEA. Trietilamina
TMA. Trimetilamina
TTC. Umbral de preocupación toxicológica

INTRODUCCIÓN

Los compuestos *N*-nitrosos, de interés en el campo toxicológico, comprenden dos grupos de derivados: *N,N*-nitrosaminas (R_1NNOR_2) y *N,N*-nitrosamidas ($R_1NNOCOR_2$).

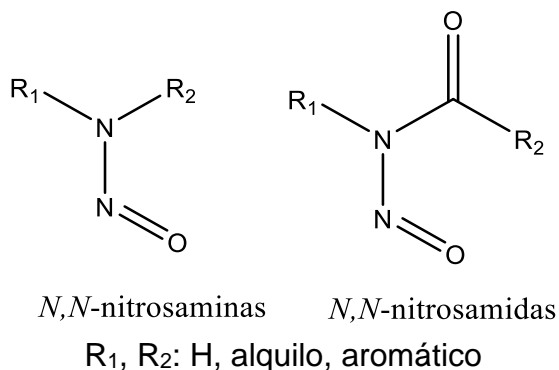


Figura 1. Estructura general de *N,N*-nitrosaminas y *N,N*-nitrosamidas

La exposición a estos compuestos se puede dividir en dos modalidades:

- Exposición exógena, que abarca a los estilos de vida y exposición ocupacional.
- Exposición endógena, donde se presenta la formación *in vivo* de las nitrosaminas a través de la ingesta de aminas nitrosables y agentes nitrosantes.

En lo referente a los estilos de vida que contribuyen a la exposición a estos agentes se encuentran el uso de cosméticos, el consumo de tabaco y medicamentos; por otro lado, para la exposición ocupacional la industria de metales, la industria química y la minería podrían ser algunas de las que contribuyan a esto.

Para comprender la formación de estos compuestos, en su variante endógena, es necesario señalar que los precursores se encuentran en los alimentos, por lo que su ingesta se puede visualizar de la siguiente manera:

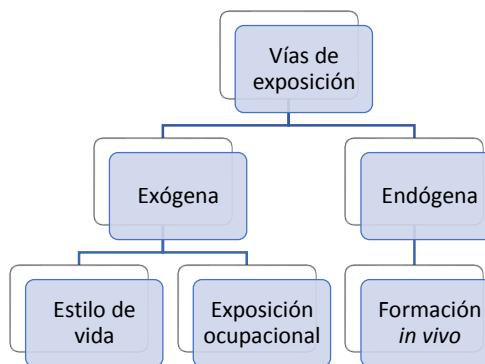


Figura 2. Esquematación de las vías de exposición a compuestos *N*-nitrosos



Figura 3. Obtención de compuestos *N*-nitrosos en la ingesta

Los precursores son generalmente nitritos de los alimentos producidos por la reducción de fertilizantes de nitrato o agregados como conservadores; además de las aminas orgánicas presentes en los alimentos consumidos y los nitratos presentes de manera normal en una gran cantidad de vegetales.

Por otra parte, en la variante exógena, los compuestos formados provienen de la síntesis de los fármacos que constituyen a algunos medicamentos.

Formación de los compuestos *N*-nitrosos

La formación de estos compuestos se puede analizar cómo se describe a continuación:

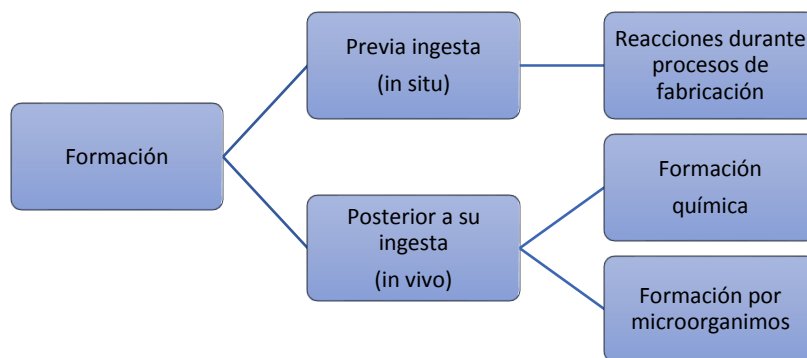


Figura 4. Esquematización de la formación de compuestos *N*-nitrosos

La formación previa a la ingesta (*in situ*) será discutida posteriormente en este texto.

Para el caso de la formación posterior a la ingesta (*in vivo*), se proponen dos escenarios:

- **Formación química.** Con respecto a las *N,N*-nitrosaminas, estas pueden formarse a partir de aminas y agentes nitrosantes (generalmente compuestos que contienen nitrógeno oxidado, NO_x) bajo ciertas condiciones de reacción. Estas especies de NO_x tienen diferentes reactividades y pueden reaccionar con las aminas de forma diferente dependiendo, por ejemplo, del pH del medio de reacción y de la naturaleza del disolvente. A un pH ácido, los reactivos nitrosantes más potentes están presentes, pero la amina está

protonada, por lo tanto, menos reactiva. Ante esto, las condiciones efectivas de nitrosación dependen tanto del pH como de la basicidad de la amina. El ácido nitroso forma sales con aminas básicas que, cuando se calientan, pueden reaccionar para producir *N,N*-nitrosaminas.

La formación de las *N,N*-nitrosaminas dentro del organismo se lleva a cabo por la reacción de compuestos nitrosantes presentes en el ambiente ácido del estómago, con las aminas. Las aminas secundarias forman nitrosaminas más estables, mientras que las formadas por aminas primarias se descomponen rápidamente; las aminas terciarias son poco reactivas (1).

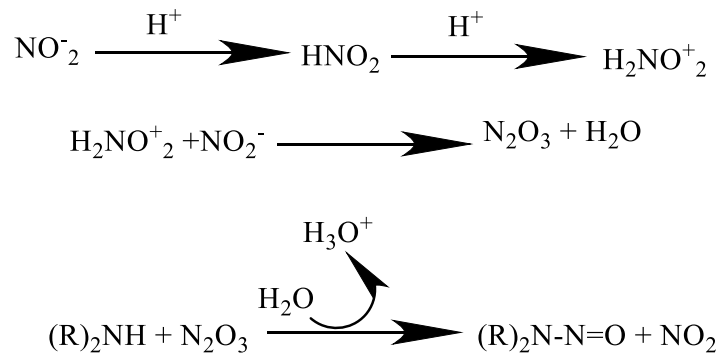


Figura 5. Mecanismo de formación de *N,N*-nitrosaminas (2)

El nitrito se protona para formar el ácido nitroso, el cual en medio ácido forma el intermediario H_2NO_2^+ . Este último reacciona con otra molécula de nitrito para formar anhídrido de nitrógeno (N_2O_3). El anhídrido de nitrógeno dona el grupo nitroso a las aminas para producir *N,N*-nitrosaminas (3).

La reacción de nitrosación puede ocurrir en el estómago por la reacción del óxido nítrico del nitrito o nitrato, con aminas, en condiciones ácidas. El pH óptimo de la reacción es de 3 a 4 y se ha reportado la síntesis de las nitrosaminas en el estómago del conejo, el gato y el humano (4, 5); por lo que la formación de *N,N*-nitrosaminas dentro del organismo si es viable. Las *N,N*-nitrosaminas son químicamente estables en condiciones fisiológicas.

Por otro lado, las *N,N*-nitrosamidas son originadas por la reacción de compuestos nitrosantes con amidas, ureas, carbonatos y guanidinas. La nitrosación de la amida es catalizada por ácido, por lo que el estómago es el sitio *in vivo* para llevar a cabo esta reacción. A diferencia de las *N,N*-nitrosaminas, son inestables a pH fisiológico (6). Dada su inestabilidad, probablemente no persisten en los alimentos y, por lo tanto no pueden ser ingeridos como tales.

- Formación por microorganismos. Los mecanismos de participación y/o catálisis para la formación de *N,N*-nitrosaminas incluyen (7):
 - a) Disminución del pH del sistema
 - b) Reducción de nitrato a nitrito

- c) Degradación de proteínas a aminas secundarias
- d) Adsorción de amina en la superficie celular o membrana citoplasmática

Dentro del organismo, los microorganismos reducen el nitrato a nitrito, degradan las proteínas a aminas secundarias y crean un ambiente apropiado (ligeramente ácido) para la formación de nitrosaminas (8).

Se ha observado que in vivo el mecanismo que más participa en la formación de *N,N*-nitrosaminas es la reducción de nitratos a nitritos, mediante los procesos bioquímicos bacterianos de nitrificación, muchas especies de bacterias nitrificantes tienen sistemas complejos en membrana donde residen las enzimas clave en la nitrificación: amoniacó monooxigenasa que oxida amoniacó a hidroxilamina y nitrito oxidorreductasa que oxida nitrito a nitrato; este proceso se lleva a cabo en el tracto gastrointestinal (7). Estas reacciones también pueden llevarse a cabo fuera del organismo, con los microorganismos presentes en cada ecosistema como, por ejemplo, en las espinacas y otras verduras, los microorganismos presentes son capaces de reducir el nitrato a nitrito (9).

En cuanto a sus propiedades físicas, las *N,N*-nitrosaminas son compuestos orgánicos estables que pueden ser aislados como líquidos destilables o sólidos cristalinos. La relativa facilidad de disociación del enlace N-NO, inducida por el tratamiento térmico, es una propiedad física común de los derivados del *N*-nitroso, pero requiere la exposición a temperaturas entre 400 °C y 500 °C. Debido a su momento dipolar, son parcialmente solubles en medios acuosos y fácilmente solubles en disolventes orgánicos. Cuanto más grandes y menos polares sean los grupos alquilo, menos soluble será una determinada *N,N*-nitrosamina en el agua.

Las *N,N*-nitrosaminas pueden sufrir varias transformaciones orgánicas sintéticas. Ellos actúan principalmente como bases de Lewis y aceptores de enlaces de hidrógeno. En condiciones ácidas, la denitrosación (la inversa del proceso de nitrosación) puede ocurrir para generar aminas secundarias y ácido nitroso. Pueden ser reducidas en diversas condiciones, por ejemplo, mediante la hidrogenación catalítica a tetrazenos; o transformadas en los correspondientes derivados de la hidracina, mediante la disolución de las reducciones de metales e hidrocarburos. Las *N,N*-nitrosaminas también pueden oxidarse hasta *N,N*-nitraminas. Después de la metalización en la posición α , pueden ser alquilados y acilados para formar el aducto correspondiente. Se ha descubierto que las α -hidroxi-*N*-nitrosaminas son extremadamente reactivas, mostrando inestabilidad in vitro en soluciones acuosas a un pH fisiológico con vidas medias de segundos.

Las *N,N*-nitrosaminas son químicamente estables bajo condiciones fisiológicas, ejerciendo sus efectos adversos después de su activación metabólica. Mientras que las *N,N*-nitrosamidas actúan de manera directa, no necesitan activación metabólica para reaccionar como derivados alquilantes.

Activación metabólica

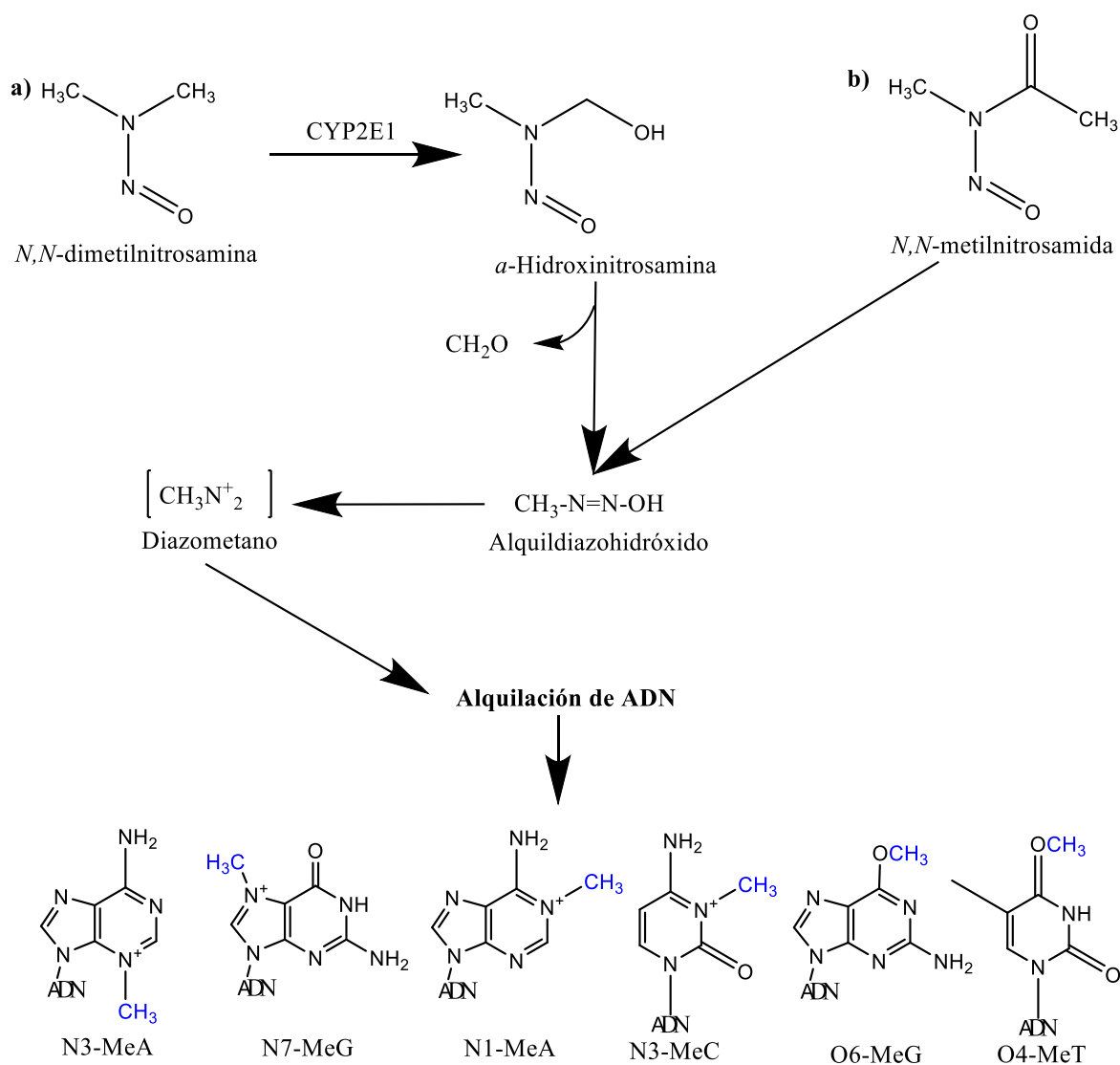


Figura 6. Metabolismo de compuestos *N*-nitrosos.

Para las *N,N*-nitrosaminas (Figura 6, inciso a), el primer paso de biotransformación es la hidroxilación del carbono α través de las enzimas microsomales CYP2E1 del citocromo P450 (sistema de monooxigenasas), el cual se expresa predominantemente en el hígado, pero también puede encontrarse a lo largo del tracto gastrointestinal (10). Durante este proceso, se forman α -hidroxialquil-*N*-alquilnitrosaminas, que a su vez se descomponen espontáneamente para producir *N*-alquildiazohidroxilos. Estos últimos pueden alquilar nucleófilos directamente, o después de la pérdida de agua, producen metabolitos más reactivos (diazalcanos), que son los alquilantes responsables de los efectos biológicos inducidos a las macromoléculas. Estos metabolitos alquilan a las bases nitrogenadas de ADN por ser carbocationes. Reaccionan con las bases de ADN, en una reacción SN1, generando al menos 12 modificaciones en este ácido nucléico. Las formas de

alquilación predominantes son en N3 de la adenina y N7 de la guanina; las cuales constituyen el 75% de los aductos de ADN alquilado. Las alquilaciones de los átomos de oxígeno dentro de las bases del ADN generan el sitio premutagénico de la O6 de la guanina (6-8%) y, en menor medida, en O4 de la timina (0.3%), en N1 adenina y N3 citosina (1.5%) (11).

Las *N,N*-nitrosamidas por su parte (Figura 6, inciso b), no necesitan una activación metabólica, la formación de intermediarios alquilantes ocurre por hidrólisis catalizada por bases y varía de acuerdo con el pH. Estos metabolitos alquilan a las bases de ADN especialmente en las posiciones N7 y O6 de la guanina y la O4 de la timina (6).

Cuando los aductos de ADN no son reparados, estos pueden tener consecuencias biológicas que incluyen citotoxicidad, mutagenicidad, clastogenicidad y carcinogenicidad. Se ha observado que las lesiones persistentes en O6 de la guanina favorecen la incorporación de timina en el lugar de la citosina, lo que resulta en mutaciones de transición de G: C a A: T (12).

Planteamiento del problema

Derivado de lo informado en 2018 y 2019 por diversos fabricantes de sartán, ranitidina y metformina, sobre la presencia de las impurezas *N,N*-dimetilnitrosamina (NDMA) y *N,N*-dietilnitrosamina (NDEA) en sus productos, se llevaron a cabo una gran cantidad de retiros en mercados internacionales como Estados Unidos, Canadá y Unión Europea. Provocando así, cuestionamientos sobre el origen de la presencia de estas impurezas en distintos grupos de medicamentos.

La preocupación de la presencia de estas impurezas en distintos productos farmacéuticos deriva del conocimiento de que los compuestos *N*-nitrosos como posibles o probables iniciadores del proceso carcinogénico en humanos (Grupos 2A y 2B en la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer, por sus siglas en inglés IARC). Por lo tanto, resulta necesario evaluar si las cantidades encontradas representan un riesgo potencial en el aumento de casos de cáncer en los pacientes. Además, de tomar a consideración que, así como la detección de estas impurezas se dio varios años después, también podrían existir casos con distintos principios activos que aún no han sido reportados.

Objetivos

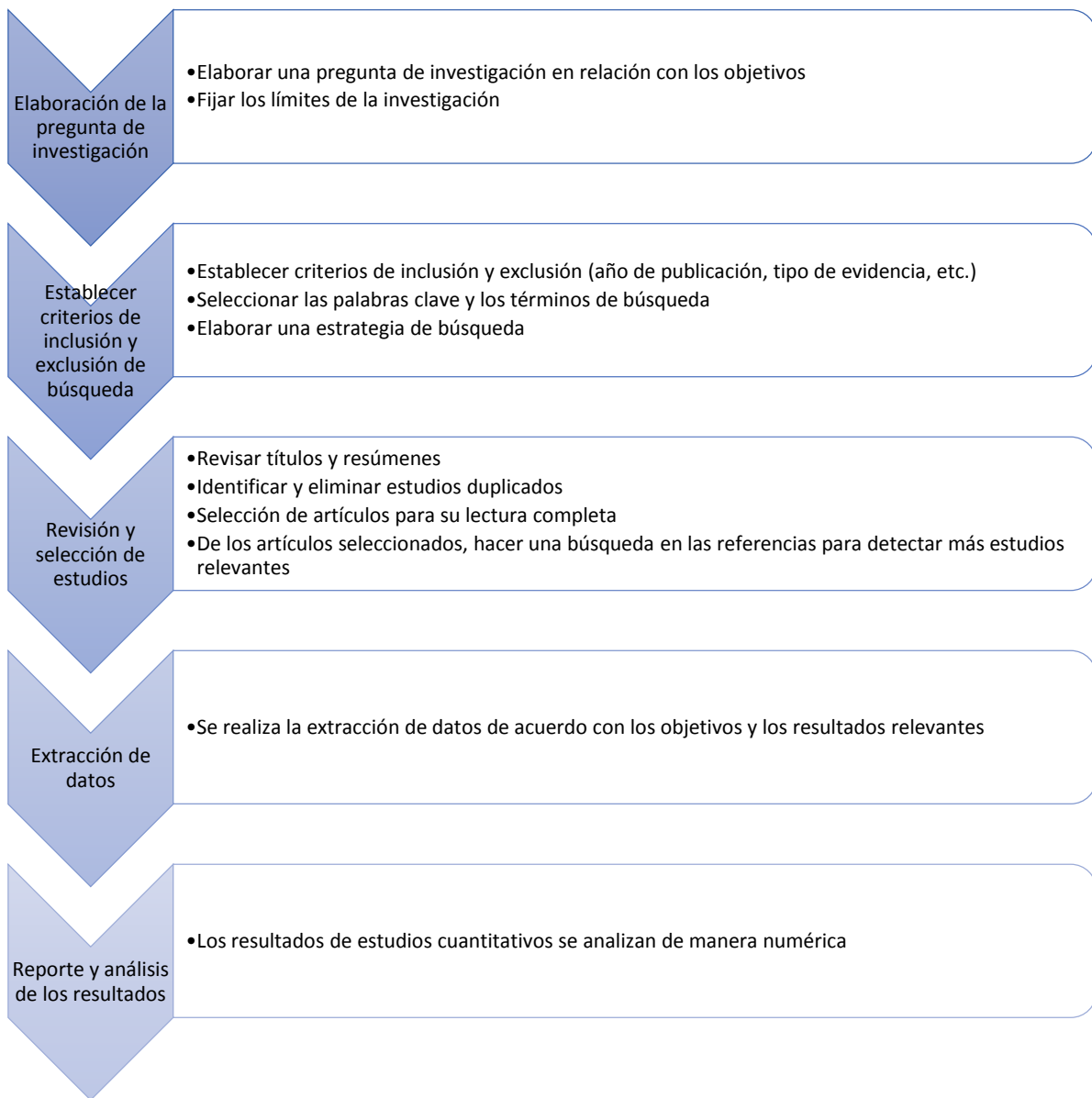
Analizar la estructura de algunos de los fármacos presentes en el mercado con potencial para formar compuestos *N*-nitrosos; así como la posible formación de carcinógenos en el momento de la síntesis del principio activo o fabricación del medicamento correspondiente.

Evaluar las acciones realizadas por las principales autoridades sanitarias internacionales, así como analizar la forma en la que éstas enfrentaron la situación y que les permitió llegar al planteamiento de los límites máximos permisibles que aseguraran un riesgo cercanamente nulo para el paciente.

Hipótesis

Aquellas moléculas orgánicas en cuya estructura presenten aminas secundarias podrán formar compuestos *N*-nitrosos, principalmente *N,N*-nitrosaminas. Sin embargo, su rendimiento dependerá del resto de la estructura y de las condiciones de reacción.

MATERIAL Y MÉTODO DE BÚSQUEDA



RESULTADOS DE LA INVESTIGACIÓN

Los humanos estamos expuestos a una gran cantidad de agentes ambientales que pueden ser dañinos y varios compuestos *N*-nitrosos entran en esta descripción (13). La toxicidad y carcinogenicidad de los compuestos *N*-nitrosos en varias especies animales está bien estudiada (14), clasificándolos así en el grupo 2A y 2B según la IARC (OMS). Las investigaciones de este grupo de compuestos iniciaron a partir de observaciones con dimetilnitrosamina.

Las propiedades toxicológicas de la dimetilnitrosamina han sido estudiadas desde 1954, después de la aparición de dos casos de cirrosis en hombres cuyo trabajo en un laboratorio de investigación se utilizaba dimetilnitrosamina. Los estudios preliminares revelaron que esta sustancia producía lesiones hepáticas (15). Los primeros estudios en animales se hicieron principalmente en ratas albinas con observaciones adicionales en ratones, cuyos, conejos y perros (**Tabla 1**).

Tabla 1. Resultados preliminares obtenidos con un compuesto *N*-nitroso

	<i>Intoxicación aguda</i>	<i>Efecto subcutáneo</i>	<i>Intoxicación crónica</i>
Rata	DL ₅₀ intraperitoneal 26.5 (20.5-34.2) mg/kg. DL promedio vía oral menor a 50 mg/kg. Hígado hinchado, oscuro y moteado.	Pronunciada hinchazón abdominal	50 ppm. Después de 110 días se observó una pérdida de peso significativa comparada con el grupo control 100 ppm. Todas las ratas murieron entre los días 62 y 95. 200 ppm. Todas las ratas murieron o tuvieron que ser sacrificadas entre los días 34 y 37.
Conejo	Una dosis de 15 mg/kg fue letal en conejos en menos de 24 horas. Hígado oscuro, grande y friable.	Conejos que sobrevivieron a dosis de 10 mg/kg presentaban exudado peritoneal.	
Ratón	Muerte dentro de las 30 horas a una dosis de 20 mg/kg. Hígado hinchado, rojo y moteado.	Exudado peritoneal	
Cuyo	Muerte entre el cuarto y octavo día de administración a una dosis de 25-50 mg/kg. Hígado congestionado y moteado.	Exudado peritoneal	

Perro	<p>Primer perro con única dosis oral de 50 mg/kg presentó vómito y murió 20 horas después. Intestino y estómago llenos de sangre sin observaciones anormales en el hígado.</p> <p>Segundo perro con dosis oral única de 20 mg/kg murió en menos de 24 horas sin hemorragia peritoneal.</p> <p>Tercer perro con tres dosis orales de 10 mg/kg, al séptimo día ya estaba inconsciente.</p>		
--------------	--	--	--

En 1956 se reportó por primera vez, la observación de la formación de tumores malignos hepáticos en ratas que fueron alimentadas con *N,N*-dimetilnitrosamina (16) al realizar tres experimentos (**Tabla 2**).

Tabla 2. Resultados preliminares en la formación de tumores.

Experimento	Observaciones
1	Resultados concordantes con lo reportado por Barnes y Magee (1954) al alimentar ratas albinas con 50, 100 y 200 ppm de dimetilnitrosamina.
2	<p>Ratas albinas alimentadas con una dieta que contiene 50 ppm de dimetilnitrosamina.</p> <p>Las muertes comenzaron desde la semana 27 hasta la 42.</p> <p>Se encontró un sarcoma en las glándulas mesentéricas.</p> <p>Tumores principalmente anaplásicos con diversos grados de formación pseudo-acinar.</p> <p>De 20 los animales, 11 murieron por efectos de una hemorragia aguda en la cavidad peritoneal.</p> <p>19 ratas desarrollaron tumores hepáticos primarios.</p> <p>Hígados irregulares con un número variable de nódulos dispersos.</p> <p>No se encontraron tumores primarios en algún otro lugar.</p>
3	<p>Seis conejos fueron alimentados con una dieta que contenía 20 ppm de dimetilnitrosamina por diez semanas, posteriormente se aumentó la dosis a 30 ppm por 4 semanas más y después 50 ppm por 8 semanas más. La mayoría murió o tuvo que ser sacrificados entre las semanas 18-20.</p> <p>Hígado pequeño y oscuro.</p> <p>No se observaron nódulos, quistes o hemorragias.</p> <p>No hubo evidencia de neoplasia.</p>

Después de estos dos artículos, la búsqueda de la actividad carcinogénica, mecanismo de acción, metabolismo, propiedades físicas y químicas, aumentó exponencialmente no sólo para la *N,N*-dimetilnitrosamina sino también para otros

compuestos nitrosos debido al gran interés en el rol que juegan estos compuestos en productos como el tabaco y alimentos procesados. De esta forma, y después de decenas de artículos publicados por diferentes investigadores, se logró observar la actividad carcinogénica de varios compuestos nitrosos en distintas especies animales (**Tabla 3**).

Tabla 3. Resumen de toxicidad de varios compuestos en diversas especies animales (17).

Compuesto	Toxicidad aguda en ratas Dosis (mg/kg)	Actividad carcinogénica		
		Especie	Órgano	Tratamiento
N,N-dimetilnitrosamina	27-41	Rata	Hígado	Alimento
			Riñón	Alimento 1-12 semanas Administración subcutánea y oral 1-10 dosis
			Pulmón	Alimento y dosis diaria repetida oral
			Seno nasal	Inhalación, dosis únicas y repetidas
		Ratón	Hígado	Alimento
			Riñón	Bebida y subcutáneo
			Pulmón	Bebida y subcutáneo
		Hámster dorado	Hígado	Bebida
		Trucha	Hígado	Alimento
N,N-dietilnitrosamina	216	Rata	Hígado	Bebida vía rectal 5 semanas
			Riñón	Dosis oral o intravenosa
			Esófago	Bebido
		Ratón	Hígado	Bebido
			Estómago	Bebido por 30 semanas
			Cavidad nasal	Percutánea diario por 6 semanas
		Cuyo	Hígado	Bebido 30-40 semanas
			Pulmón	Bebido 30-40 semanas
		Conejo	Hígado	Bebido 80 semanas
		Perro	Hígado	Comida y agua
		Mono	Hígado	Dosis orales diarias
		Pez	Hígado	Agua
		Hámster dorado	Hígado	2 administraciones orales semanalmente, por 7 meses
			Pulmón y bronquios	Oral por dos semanas
Pulmón y bronquios	Transplacentario en hámster preñada			

			Cavidad nasal	Subcutánea, intraperitoneal, intradérmica
N,N-di-n-butilnitrosamina	1200	Rata	Hígado	En alimento diario 75 mg/kg
			Vejiga	En alimento diario 37 mg/kg Subcutáneo 200 mg/kg en una semana
			Esófago	En alimento diario 37 mg/kg
N,N-di-n-amilnitrosamina	1750	Rata	Hígado	En agua
			Pulmón	En agua
N,N-4-hidroxi-butilnitrosamina	1800	Rata	Vejiga	En agua
N,N-butilmetilnitrosamina	130	Rata	Hígado	30 dosis orales

Una vez confirmada su carcinogenicidad, se comenzó a explorar más allá de ésta. Las evaluaciones para demostrar teratogenicidad iniciaron en 1966, donde se observó que una sola administración de etilnitrosourea en ratas preñadas inducía tumores malignos después del doceavo día de gestación en cerebro, médula espinal y sistema nervioso periférico (18). Sin embargo, la *N,N*-dimetilnitrosamina no mostró efectos similares ya que a pesar de demostrar toxicidad no resultó ser carcinogénica para el feto, sólo cuando se administró en los últimos días de gestación. A una dosis máxima tolerada de 10 mg/kg produjo tumores poco caracterizados en la descendencia después de dos años (19). Por su parte, la *N,N*-dietilnitrosamina demostró no ser teratogénico. A una dosis de 70 mg/kg intravenoso a los quince días de gestación no produjo ningún tumor, sólo con 150 mg/kg (95% de DL₅₀ fetal) en los últimos días de gestación se presentaron tumores (20).

Casi sesenta años después de que las primeras publicaciones con respecto a la carcinogenicidad, teratogenicidad y mutagenicidad de los compuestos nitrosos comenzaran a salir, se siguen realizando estudios de estas moléculas que continúan confirmando estos efectos adversos.

La formación de tumores ha sido confirmada de tal manera que para el estudio de carcinoma hepatocelular se recomienda el uso de *N,N*-dietilnitrosamina (**Figura 7**) para inducir tumores en ratones (21), también se sugiere que se utilicen ratones macho ya que se ha observado que la incidencia de carcinoma hepatocelular es género dependiente en ratones y humanos (**Figura 8**), con alta prevalencia en el género masculino (22).

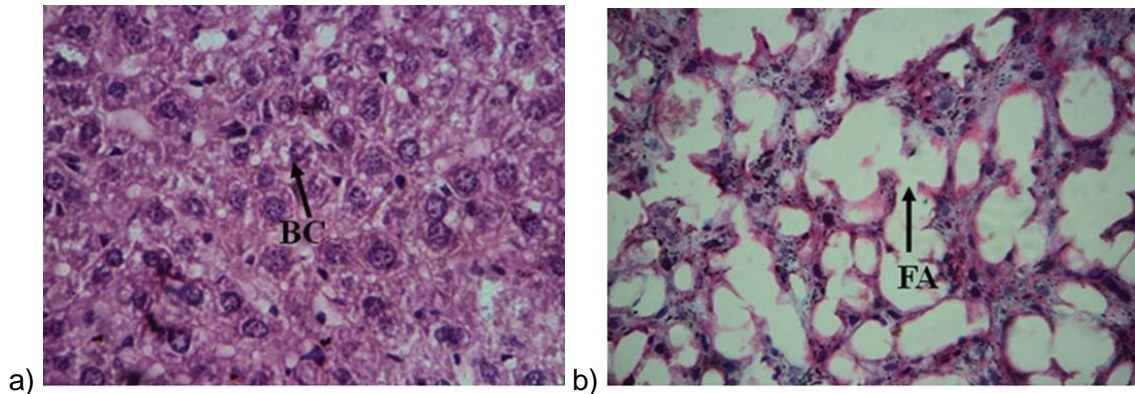


Figura 7. Evaluación microscópica de tejido hepático en ratones albinos suizos (a) control que muestra hepatocitos normales, (b) Grupo tratado con dietilnitrosamina (DEN) mostrando alta acumulación de grasa en los hepatocitos (23).

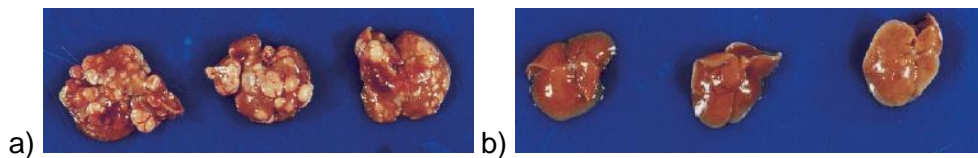
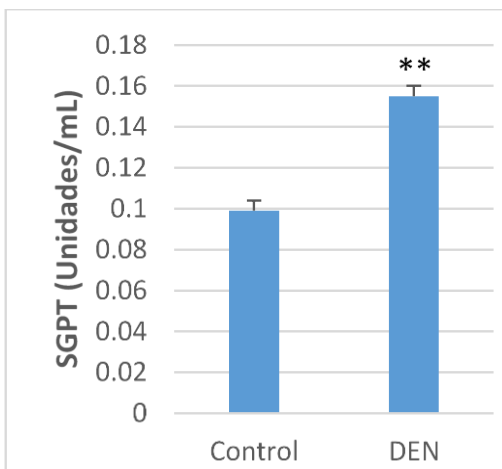


Figura 8. Observación macroscópica de nódulos formados a causa de DEN en ratones a) machos, b) hembras (22).

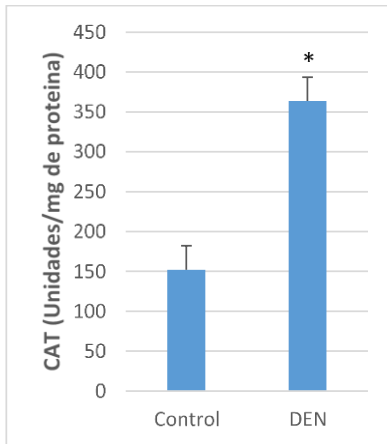
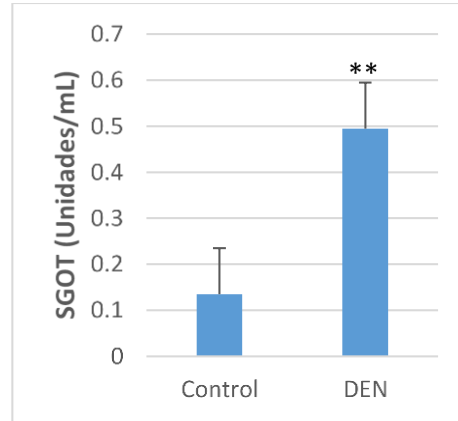
Estudios enzimáticos y hormonales

Además, se han realizado ensayos con marcadores enzimáticos donde se han observado alteraciones en la actividad y secreción de algunas enzimas en ratones albinos suizos tratados con *N,N*-dietilnitrosamina a una dosis de 20 mg/kg por 4 semanas (23) (**Gráficas 1-5**).



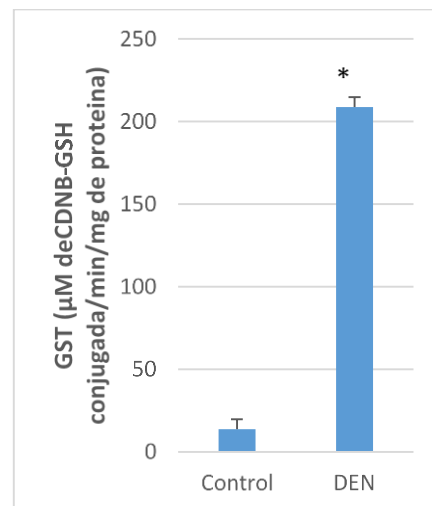
Gráfica 1. Ratones albinos suizos tratados con *N,N*-dietilnitrosamina (20 mg/kg), Los valores de actividad de la transaminasa glutámico-pirúvica sérica (SGPT) se expresan como media \pm desviación estándar, n=6 en cada grupo, **P<0.001 en comparación con el grupo control.

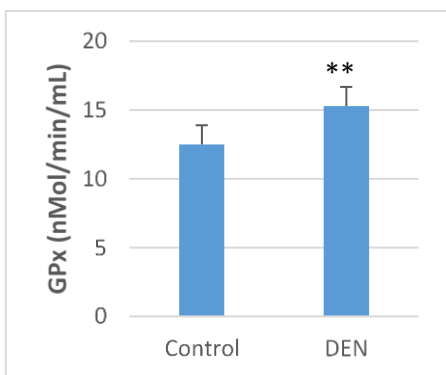
Gráfica 2. Ratones albinos suizos tratados con *N,N*-dietilnitrosamina (20 mg/kg), Los valores de actividad de glutamato-oxalacetato transaminasa sérica se expresan como media \pm desviación estándar, n=6 en cada grupo, **P<0.001 en comparación con el grupo control.



Gráfica 3. Ratones albinos suizos tratados con *N,N*-dietilnitrosamina (20 mg/kg), Los valores de actividad de catalasa en hígado se expresan como media \pm desviación estándar, n=6 en cada grupo, *P<0.05 en comparación con el grupo control.

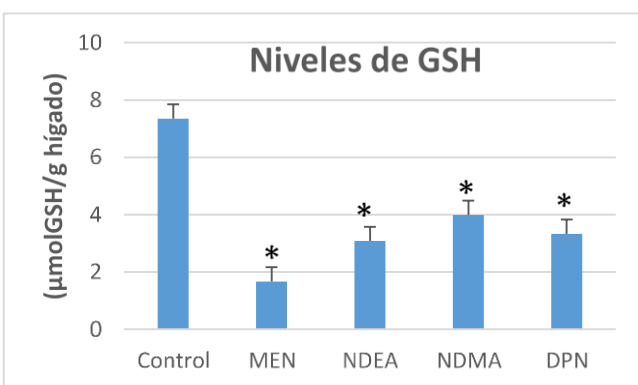
Gráfica 4. Ratones albinos suizos tratados con *N,N*-dietilnitrosamina (20 mg/kg), los valores de actividad en hígado de glutatión-S-transferasa se expresan como media \pm desviación estándar, n=6 en cada grupo, *P<0.05 en comparación con el grupo control.





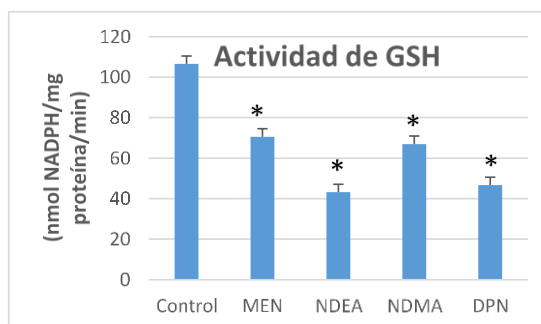
Gráfica 5. Ratones albinos suizos tratados con *N,N*-dietilnitrosamina (20 mg/kg), los valores de la actividad de glutatión peroxidasa se expresan como media \pm desviación estándar, $n=6$ en cada grupo, ** $P<0.001$ en comparación con el grupo control.

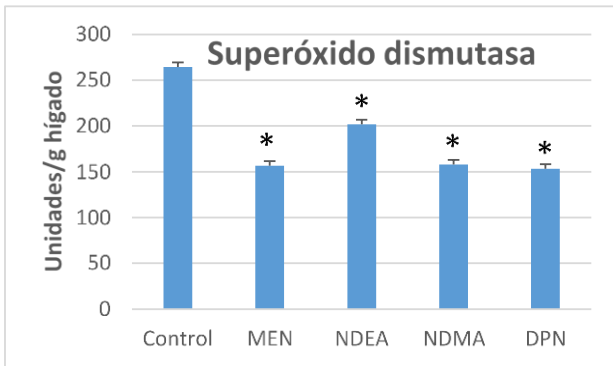
Otros estudios mostraron las alteraciones de diversas enzimas en hígado de conejos machos Nueva Zelanda tratados con *N*-metilnitrosamina (MEN), *N,N*-dietilnitrosamina (NDEA), *N,N*-dimetilnitrosamina (NDMA) y *N,N*-difetilnitrosamina (DPN) (13) (**Gráficas 6-10**).



Gráfica 6. Cambios en los niveles de glutatión después del tratamiento de conejos machos con una dosis diaria de MEN, NDEA, NDMA y DPN durante 12 semanas, * $P<0.05$ en comparación con el grupo control.

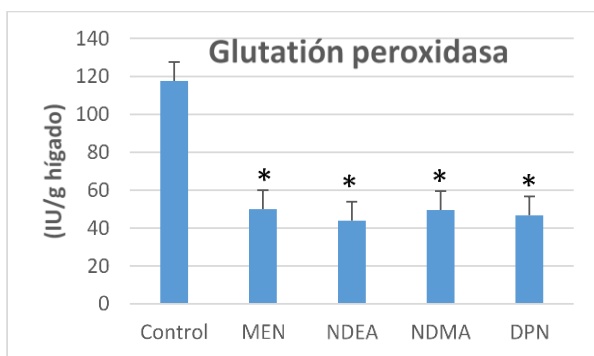
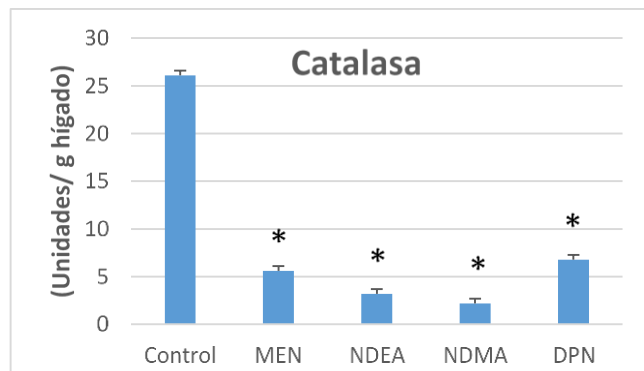
Gráfica 7. Cambios en la actividad de glutatión después del tratamiento de conejos machos con una dosis diaria de MEN, NDEA, NDMA y DPN durante 12 semanas, * $P<0.05$ en comparación con el grupo control.





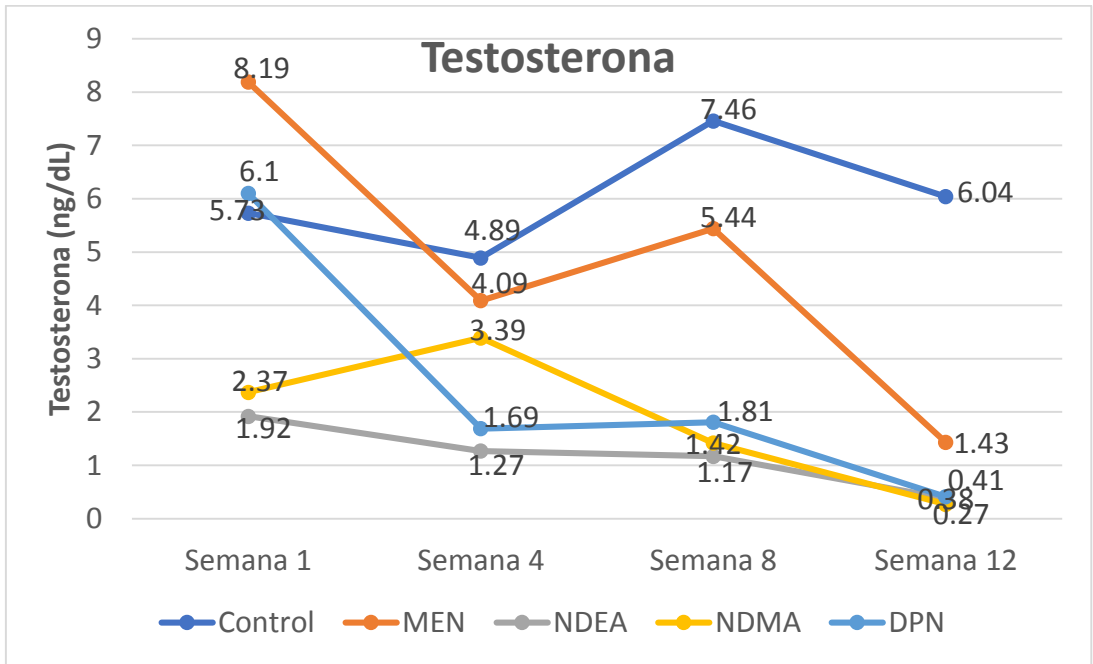
Gráfica 8. Cambios en superóxido dismutasa después del tratamiento de conejos machos con una dosis diaria de MEN, NDEA, NDMA y DPN durante 12 semanas, *P<0.05 en comparación con el grupo control.

Gráfica 9. Cambios en catalasa después del tratamiento de conejos machos con una dosis diaria de MEN, NDEA, NDMA y DPN durante 12 semanas, *P<0.05 en comparación con el grupo control.

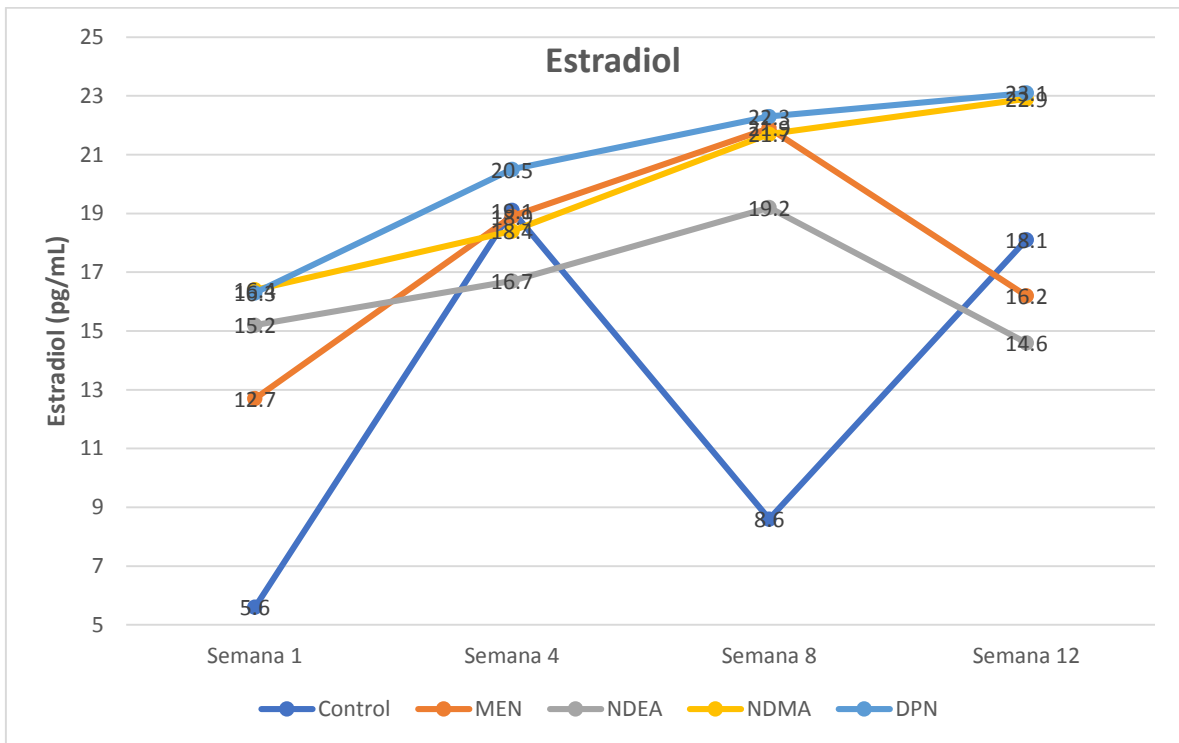


Gráfica 10. Cambios en glutación peroxidasa después del tratamiento de conejos machos con una dosis diaria de MEN, NDEA, NDMA y DPN durante 12 semanas, *P<0.05 en comparación con el grupo control.

Además, este mismo estudio observó un cambio en niveles hormonales de testosterona y estradiol.

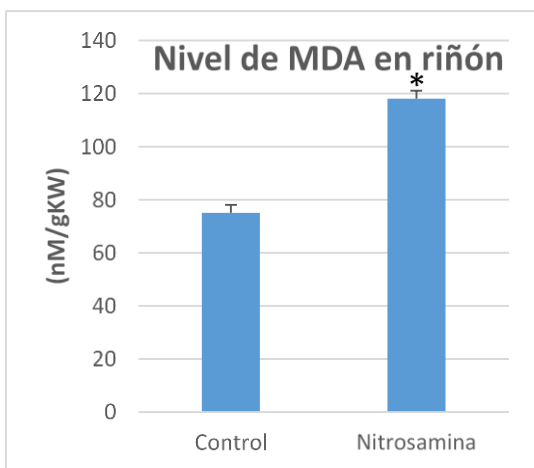


Gráfica 11. Cambios en los niveles de testosterona en plasma a distintas semanas de tratamiento en conejos machos con diferentes *N*-nitrosaminas.



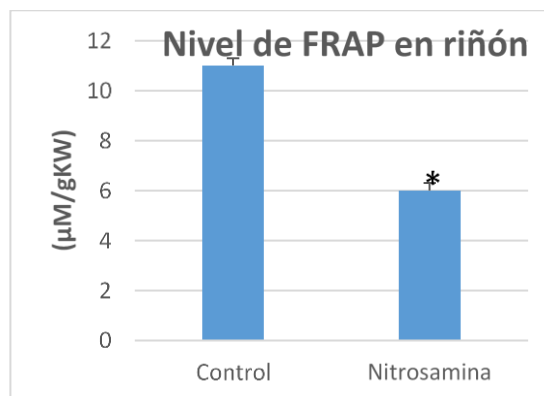
Gráfica 12. Cambios en los niveles de estradiol en plasma a distintas semanas de tratamiento en conejos machos con diferentes *N*-nitrosaminas.

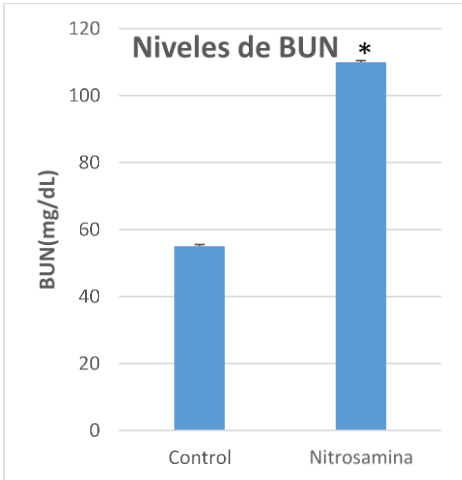
Otro estudio evaluó el efecto de nitrosaminas en riñón de ratas macho con una administración intraperitoneal con dosis única a 40 mg/kg obtuvo los siguientes resultados (14) (**Gráficas 13-16**).



Gráfica 13. Cambios en los niveles de malondialdehído (MDA) en riñón después del tratamiento de ratas macho con una dosis única de nitrosaminas a 40 mg/kg, *P<0.05 en comparación con el grupo control.

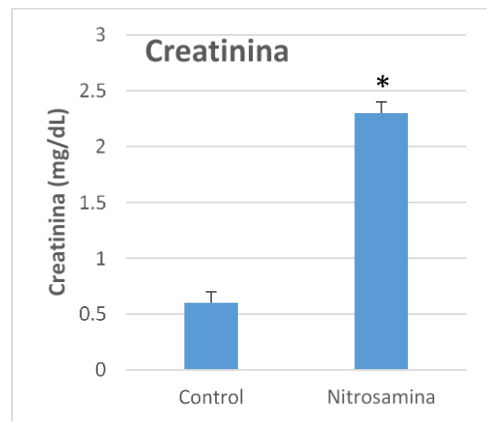
Gráfica 14. Cambios en los niveles del potencial reductor/antioxidante férrico (FRAP) en riñón después del tratamiento de ratas macho con una dosis única de nitrosaminas a 40 mg/kg, *P<0.05 en comparación con el grupo control.





Gráfica 15. Cambios en los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN, por sus siglas en inglés) después del tratamiento de ratas macho con una dosis única de nitrosaminas a 40 mg/kg, *P<0.05 en comparación con el grupo control.

Gráfica 16. Cambios en los niveles de creatinina después del tratamiento de ratas macho con una dosis única de nitrosaminas a 40 mg/kg, *P<0.05 en comparación con el grupo control.



Cabe señalar que, aunque los compuestos *N*-nitrosos han sido relacionados con diversos tipos de cáncer, en algunos estudios se ha tratado de vincular con cáncer pancreático. Sin embargo, hasta el momento, no se ha logrado encontrar una asociación directa por exposición ocupacional (24).

Metodologías de detección

El estudio de estos compuestos ha provocado a la par el desarrollo de metodologías de detección, normalmente son utilizadas la espectrometría, cromatografía o electroquímica. Sin embargo, estos métodos tienen límites de detección en órdenes menores a μM , por lo que el desarrollo de metodologías más sensibles y selectivas ha sido necesaria. Tal es el caso del uso de nano puntos de carbono en el ADN (ADN Carbon-Nanodots) basados en biosensores electroquímicos que ha permitido confirmar y estudiar la mutagenicidad de estos compuestos. Esta técnica consiste en depositar los puntos de carbono de quitosano en un electrodo de carbono vítreo (GCE), luego el ADN se inmoviliza electrostáticamente en la superficie de los puntos de carbono para obtener el electrodo sensor (ADN/chíCD/GCE) siendo altamente selectivo y sensible a *N,N*-dimetilnitrosamina (NDMA) y *N,N*-dietilnitrosamina (NDEA) y haciendo uso de técnicas de voltamperometría de pulso diferencial, la corriente máxima absoluta aumenta detectando así, los compuestos *N*-nitrosos como se muestra en la **Figura 9**. El ADN expuesto a NDMA y NDEA provoca la generación de aductos, formado así 6-O-metilguanina y 8-oxiguanina, estos aductos generan una diferencia de pulso en el voltamograma (25).

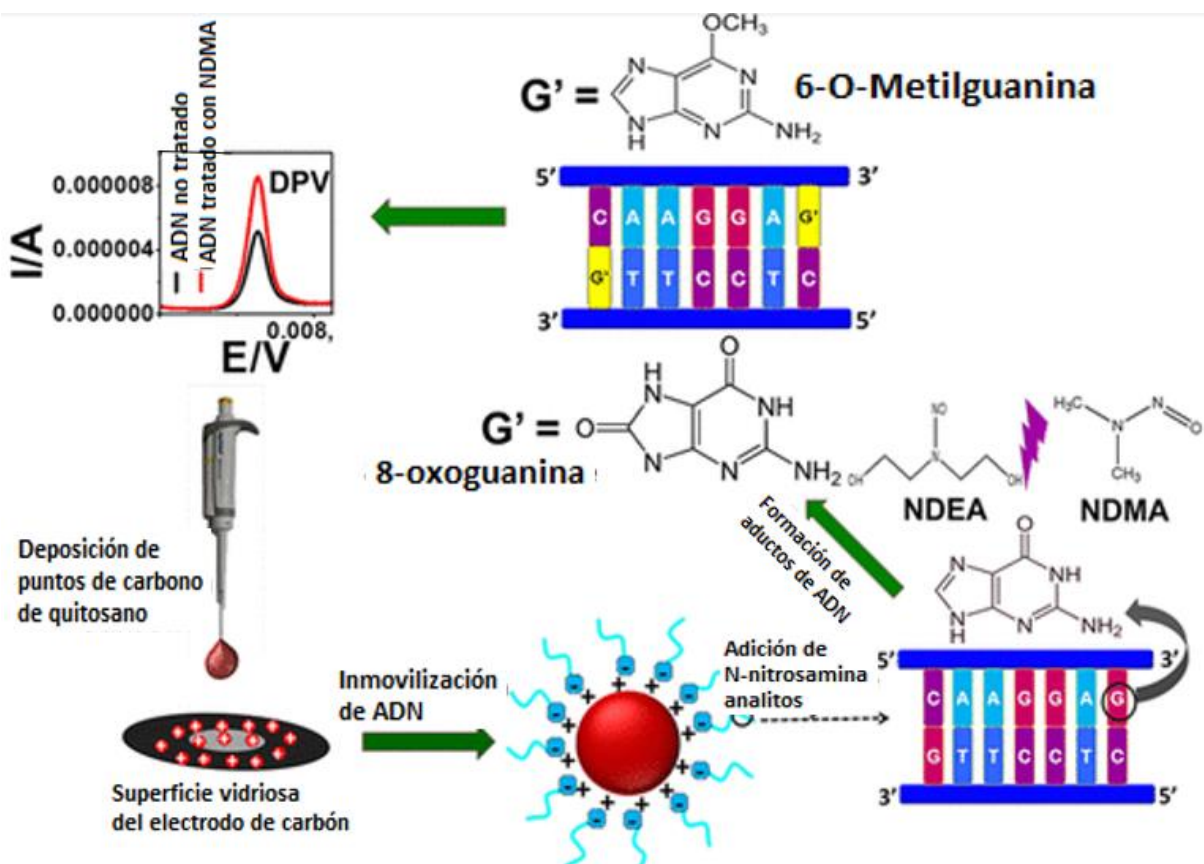


Figura 9. Representación del mecanismo de formación de aductos de ADN, así como el voltamograma de pulso diferencial de ADN tratado y no tratado con NDMA y NDEA.

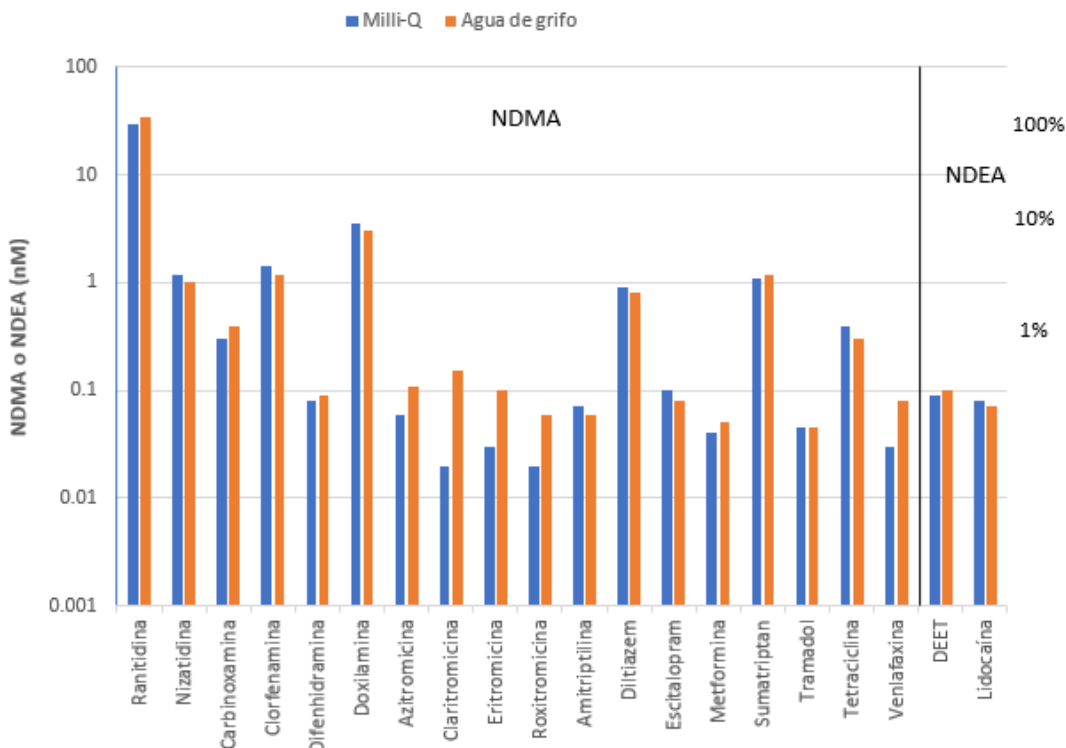
Formación a partir de productos farmacéuticos

Las primeras investigaciones señalan que la formación de compuestos *N*-nitrosos utiliza como precursor a la dimetilamina (DMA), pero poco después se investigó su formación utilizando en su lugar productos farmacéuticos y de cuidado personal. Por lo que, aunque fue a partir del año 2018 cuando estos compuestos comienzan a tomar más relevancia, su aparición ya había sido documentada varios años atrás (26) donde se observaron altos porcentajes de rendimiento en la conversión de los productos con aminas en su estructura a compuestos *N*-nitrosos.

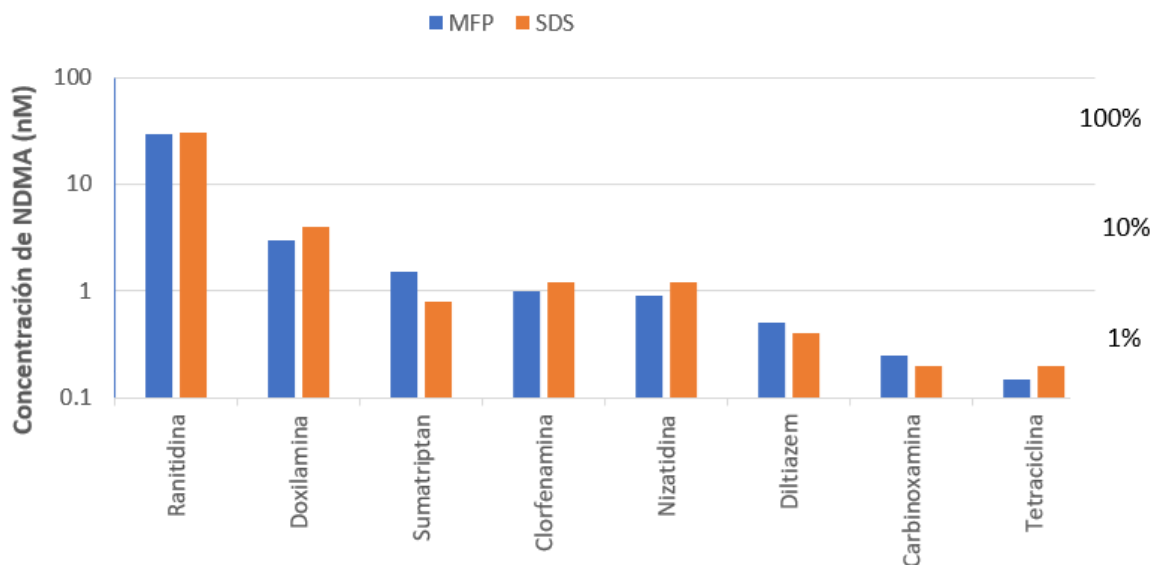
En las condiciones experimentales mostradas en la **Tabla 4**, la conversión a NDMA y NDEA de veinte productos farmacéuticos y de cuidado personal se visualiza en las **Gráficas 17-18** (26).

Tabla 4. Condiciones experimentales para la formación de nitrosaminas, donde MFP es Potencial de Formación Modificado y SDS es Sistema de Distribución Simulada.

Condiciones experimentales	MFP	SDS
pH	7.0 ± 0.1	7.0 ± 0.1
Temperatura	21 °C	21 °C
Tiempo de incubación	24 h	24 h
Relación masa Cl₂: N	4.2:1	4.2:1
Dosificación de cloramina	28.4 ± 0.2 mg/L	2.5 ± 0.2 mg/L

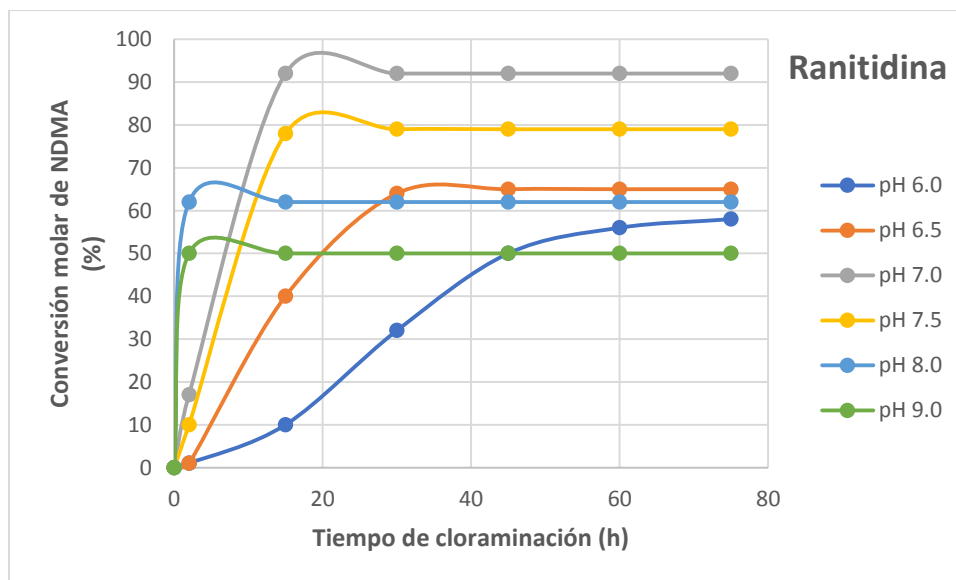


Gráfica 17. Presentación de la concentración nM y % de conversión a NDMA y NDEA bajo las condiciones MFP a una concentración inicial de los productos de 25 nM.

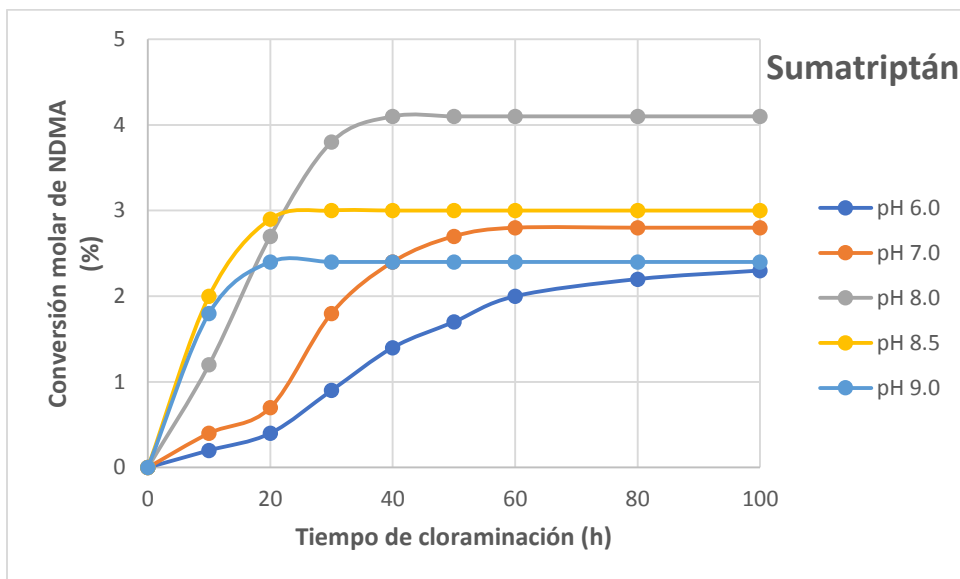


Gráfica 18. Comparación entre las dos condiciones experimentales con agua de grifo y una concentración inicial de los productos de 25 nM

Una vez publicados estos resultados, otro grupo de científicos evaluó ahora el rol del pH en la formación de compuestos *N*-nitrosos a partir de dos productos farmacéuticos (ranitidina y sumatriptán) en cuya estructura se encuentra una amina secundaria (27) (**Gráficas 19-20**).

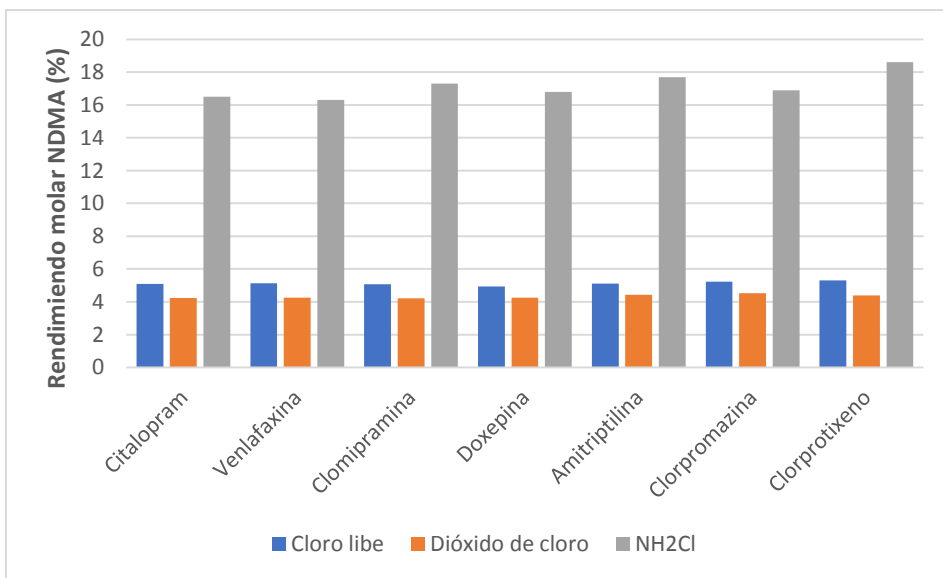


Gráfica 19. Cinética de formación de NDMA a partir de ranitidina tras la cloraminación en diferentes condiciones de pH (Milli-Q, 25 nM ranitidina. cloramina preformada=2.5 ± 0.2 mg/L)



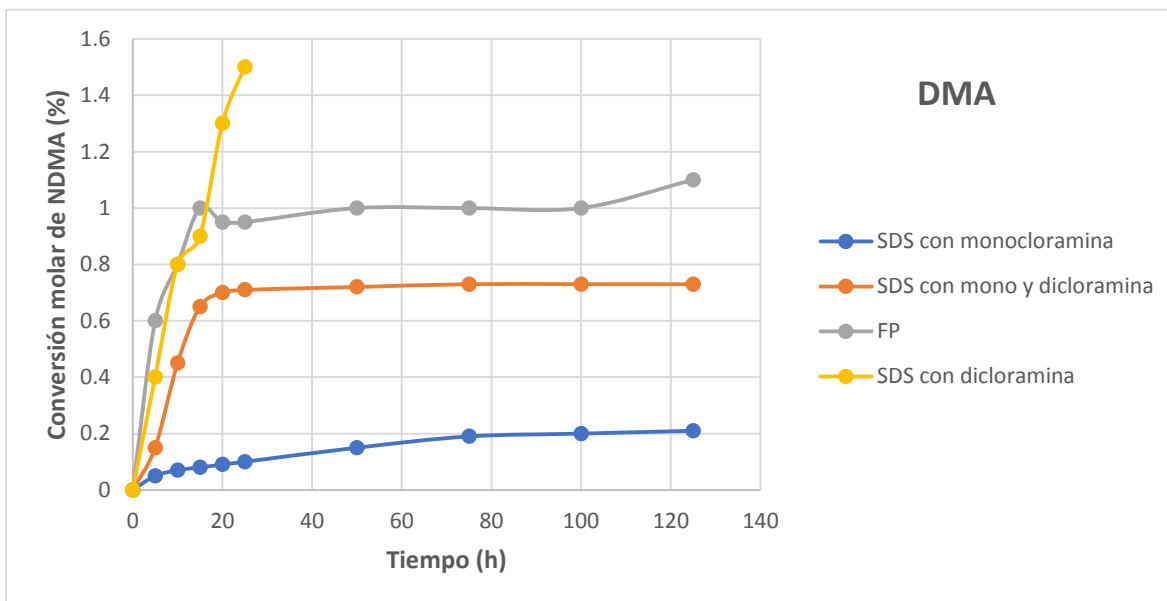
Gráfica 20. Cinética de formación de NDMA a partir de sumatriptán tras la cloraminación en diferentes condiciones de pH (Milli-Q, 25 nM sumatriptán. cloramina preformada=2.5 ± 0.2 mg/L)

En otro estudio se evaluaron siete fármacos psicoactivos como precursores de *N,N*-dimetilnitrosamina en procesos de desinfección con cloro libre, dióxido de cloro y cloramina (28).

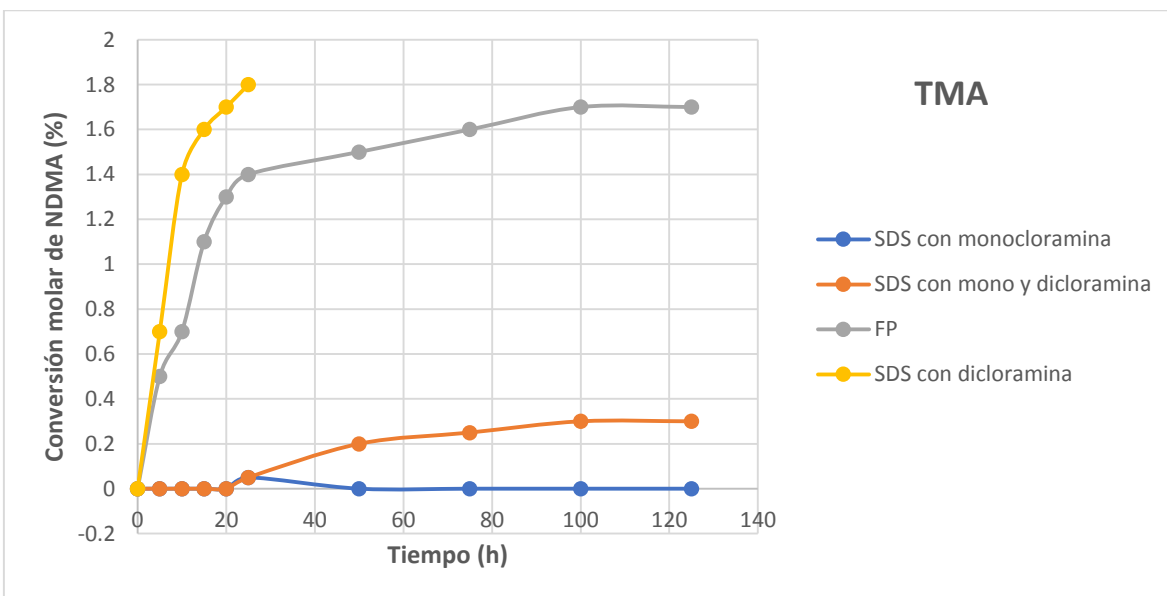


Gráfica 21. Rendimientos de formación de NDMA en siete compuestos farmacéuticos a 20 µM con diferentes desinfectantes a 1mM.

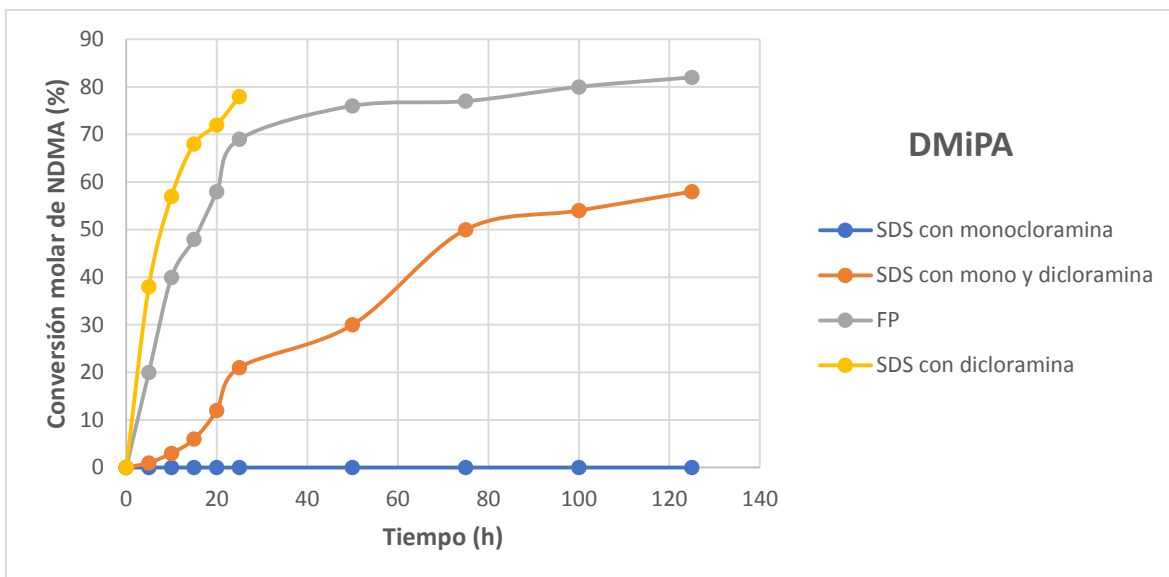
Además, el rol de las especies de cloraminas en la formación de NDMA (29) se evaluó en otro estudio (**Gráficas 22-26**).



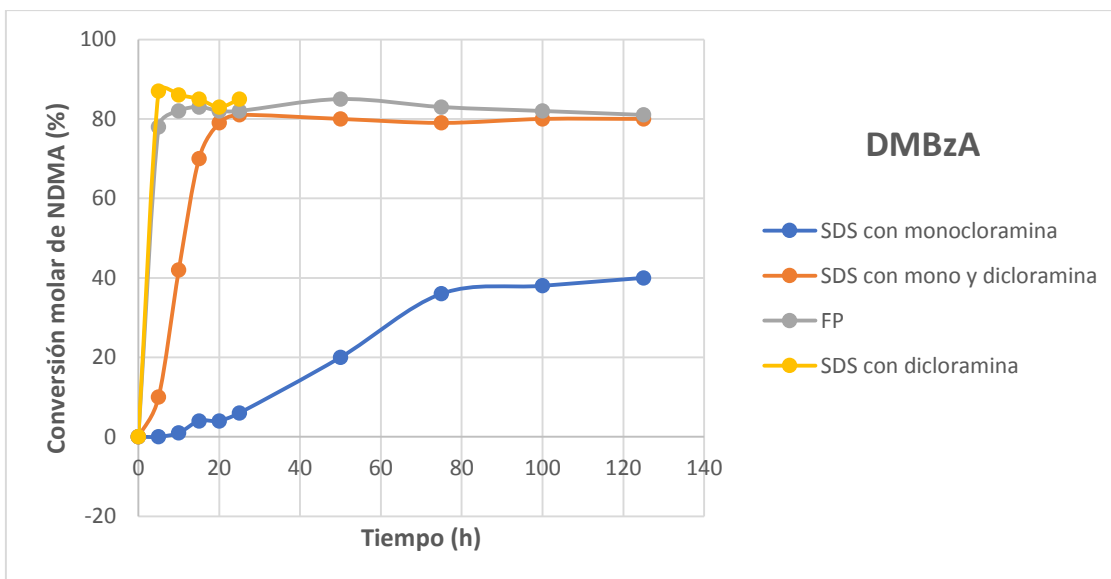
Gráfica 22. Formación de NDMA en función del tiempo a partir de dimetilamina (DMA) a distintas condiciones experimentales: i) Potencial de formación (FP) $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 100 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, ii) Sistema de distribución simulado (SDS) con dicloramina $[\text{NHCl}_2]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, iii) SDS con mono y dicloramina $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, iv) SDS con monocloramina (en presencia de exceso de amonio) $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L} + 100 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$; $\text{pH} = 7.5$ y temperatura 22°C .



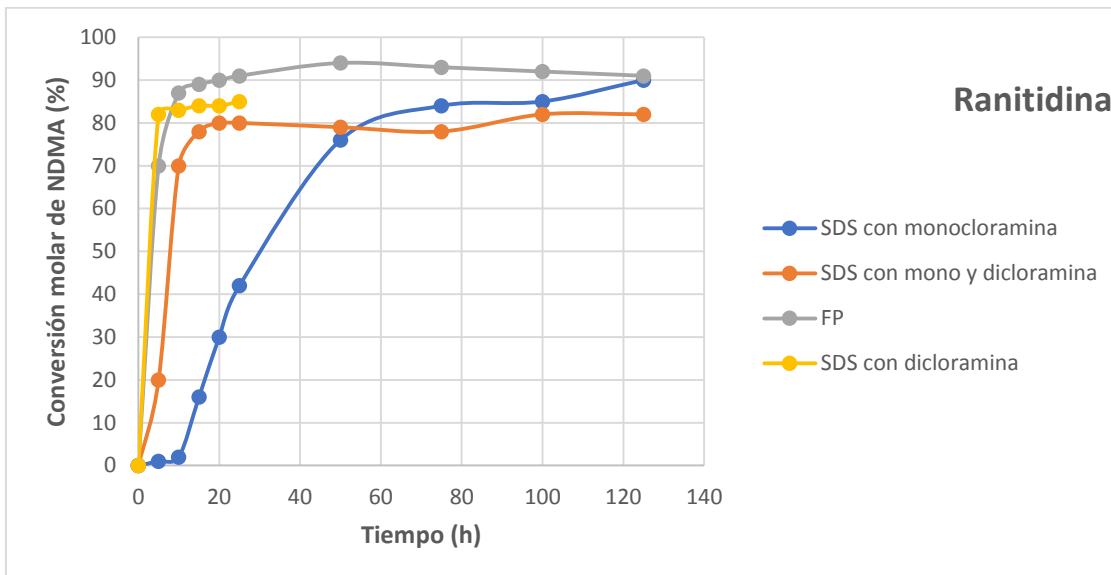
Gráfica 23. Formación de NDMA en función del tiempo a partir de trimetilamina (TMA) a distintas condiciones experimentales: i) Potencial de formación (FP) $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 100 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, ii) Sistema de distribución simulado (SDS) con dicloramina $[\text{NHCl}_2]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, iii) SDS con mono y dicloramina $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, iv) SDS con monocloramina (en presencia de exceso de amonio) $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L} + 100 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$; $\text{pH} = 7.5$ y temperatura 22°C .



Gráfica 24. Formación de NDMA en función del tiempo a partir de *N,N*-dimetilisopropilamina (DMiPA) a distintas condiciones experimentales: i) Potencial de formación (FP) $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 100 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, ii) Sistema de distribución simulado (SDS) con dicloramina $[\text{NHCl}_2]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, iii) SDS con mono y dicloramina $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, iv) SDS con monocloramina (en presencia de exceso de amonio) $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L} + 100 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$; $\text{pH} = 7.5$ y temperatura 22°C .



Gráfica 25. Formación de NDMA en función del tiempo a partir de *N,N*-dimetilbenzilamina (DMBzA) a distintas condiciones experimentales: i) Potencial de formación (FP) $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 100 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, ii) Sistema de distribución simulado (SDS) con dicloramina $[\text{NHCl}_2]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, iii) SDS con mono y dicloramina $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, iv) SDS con monocloramina (en presencia de exceso de amonio) $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L} + 100 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$; $\text{pH} = 7.5$ y temperatura 22°C .



Gráfica 26. Formación de NDMA en función del tiempo a partir de Ranitidina a distintas condiciones experimentales: i) Potencial de formación (FP) $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 100 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, ii) Sistema de distribución simulado (SDS) con dicloramina $[\text{NHCl}_2]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, iii) SDS con mono y dicloramina $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L}$, iv) SDS con monoclaramina (en presencia de exceso de amonio) $[\text{NH}_2\text{Cl}]_{\text{inicial}} = 3 \text{ mg Cl}_2/\text{L} + 100 \text{ mg NH}_4^+/\text{L}$; $\text{pH} = 7.5$ y temperatura 22°C .

Vías de nitrosación de aminas

La formación de estos compuestos no solo está relacionada con reacciones de cloraminación, existen otras vías de nitrosación de aminas que llevan a la formación de compuestos *N*-nitrosos, como se indica a continuación.

- *Nitrosación con nitrito de sodio en medio ácido (74)*

Siendo este el mecanismo general para dar lugar a la formación de *N,N*-nitrosaminas. La presencia de nitrito de sodio en medio ácido provoca la protonación del anión nitrito produciendo así ácido nitroso inestable que dará lugar al catión nitrosilo (NO^+)

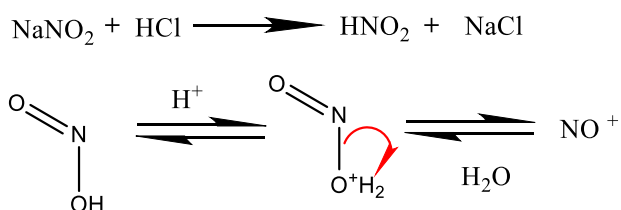


Figura 10. Formación del catión nitrosilo

Reacción con aminas primarias. Después de un ataque nucleofílico al catión NO^+ , entra a un equilibrio ácido-base, posteriormente hay una pérdida de agua para formar la sal de diazonio y finalmente su descomposición correspondiente.

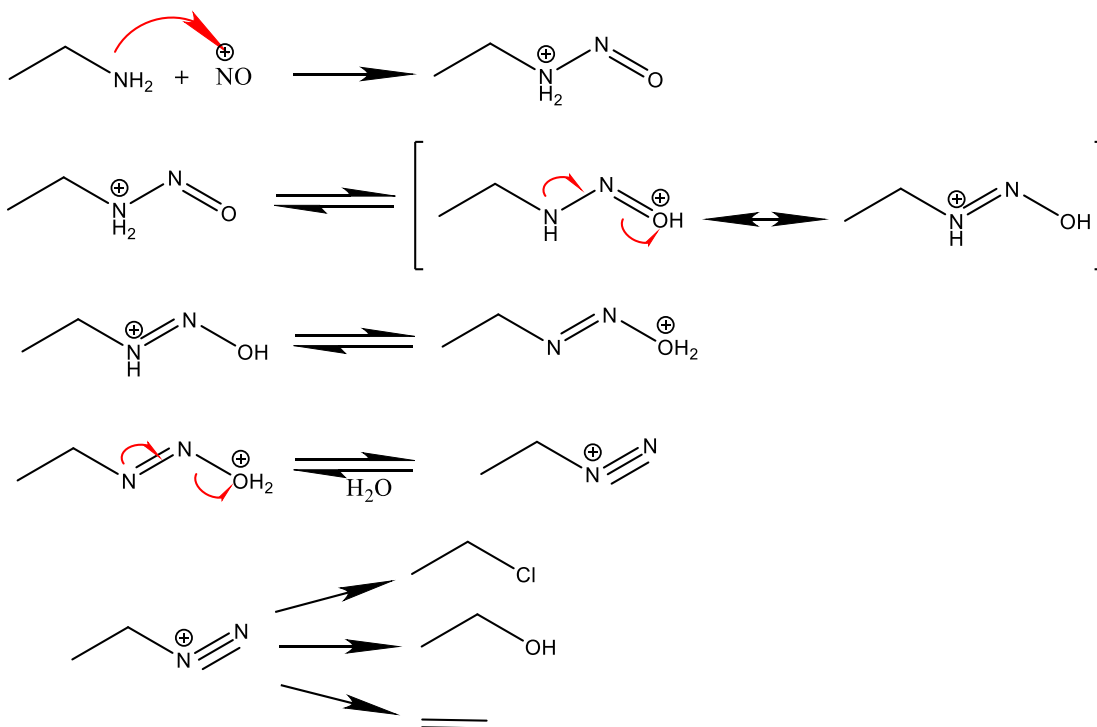


Figura 11. Reacción del catión nitrosilo con aminas primarias

Reacción con aminas secundarias. La amina secundaria ataca al catión NO^+ para la formación de nitrosaminas estables.

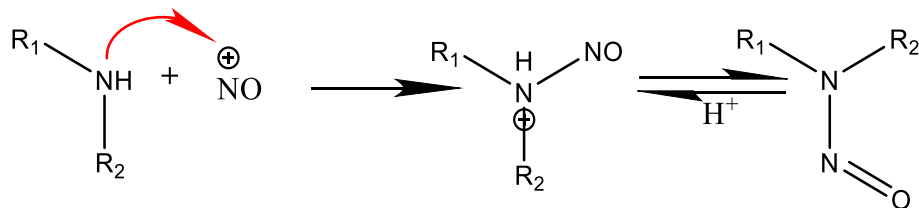


Figura 12. Reacción del catión nitrosilo con aminas secundarias

Reacción con aminas terciarias. Se forman sales de escasa estabilidad.

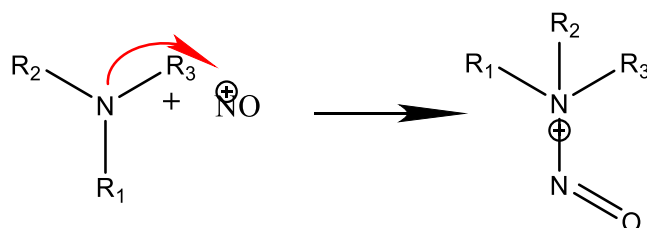


Figura 13. Reacción del catión nitrosilo con aminas terciarias

- *Nitrosación con óxidos de nitrógeno (75)*

El trióxido de dinitrógeno y tetraóxido de dinitrógeno son los reactivos que realizarán la nitrosación. El acetato de sodio o hidróxido de sodio fungen como neutralizadores de los ácidos nítricos y nitrosos formados para evitar su acumulación que provocaría la desnitrosación del producto.

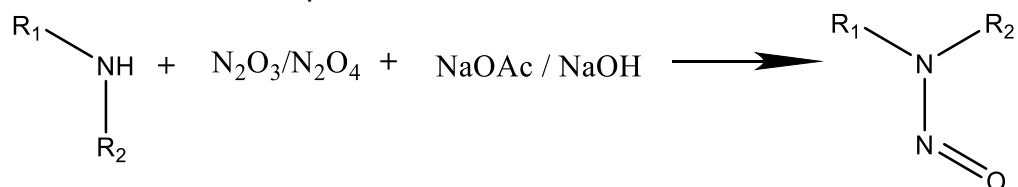


Figura 14. Reacción de nitrosación con óxidos de nitrógeno

- *Nitrosación por azida de sodio que contiene nitrito de sodio (76)*

La Autoridad Sanitaria de Canadá publicó el 02 de octubre de 2019 el documento No. 19-119258-557 donde señalaban que la azida de sodio de algunos proveedores estaba contaminada con nitrito de sodio, por lo que el tratamiento de aminas secundarias con azida de sodio contaminada en solución ácida podría conducir a la formación de N-nitrosaminas.

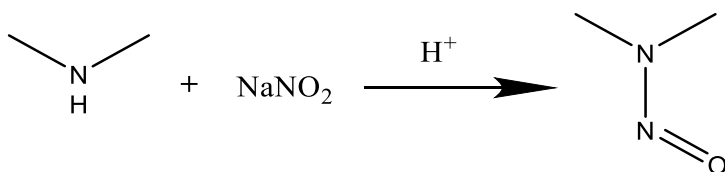


Figura 15. Reacción de nitrosación por azida de sodio conteniendo nitrito de sodio

- *Nitrosación con cloruro de nitrosilo (77)*

La nitrosación se lleva a cabo con el cloruro de nitrosilo también conocido como reactivo de Tilden, en presencia de bases como carbonato de potasio o piridina para atrapar el cloruro de hidrógeno que se forma durante la reacción.

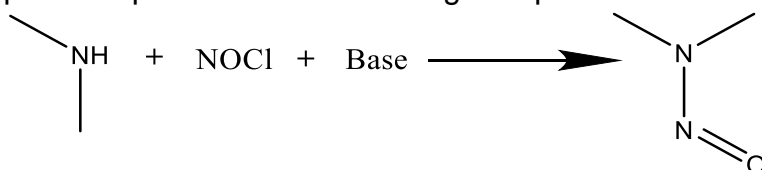


Figura 16. Reacción de nitrosación con cloruro de nitrosilo

- *Nitrosación con nitritos de alquilo (78)*

Los nitrilos de alquilo, como el nitrito de ter-butilo, el nitrito de 3-metilbutilo (nitrito de isopentilo) y el nitrito de etilo, son fáciles de manejar y reaccionan con las aminas secundarias en condiciones anhidras y, en algunos casos, en ausencia de catalizadores ácidos.

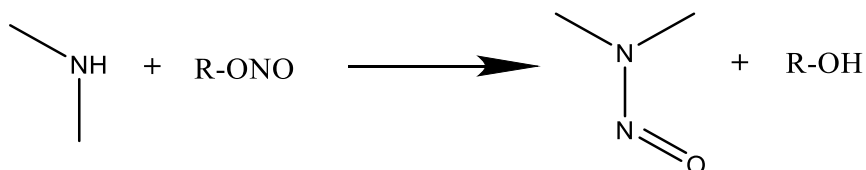


Figura 17. Reacción de nitrosación con nitritos de alquilo

- *Nitrosación con tetrafluoroborato de nitrosonio (79)*

El tetrafluoroborato de nitrosonio, como el cloruro de nitrosilo, es una fuente directa para el catión nitrosonio.

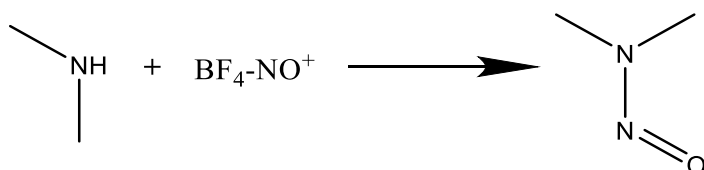


Figura 18. Reacción de nitrosación con tetrafluoroborato de nitrosonio

- *Nitrosación de aminas terciarias (80)*

La nitrosación desalquilante de aminas terciarias es una reacción que generalmente requiere condiciones extremas y, por lo tanto, a menudo solo se produce a temperaturas elevadas. Los posibles agentes son ácido nítrico acuoso o tetróxido de dinitrógeno. Para los derivados de *N*-metil dialquilamina, la nitrosación desalquilante procede predominantemente, pero no exclusivamente, a través de la desmetilación.

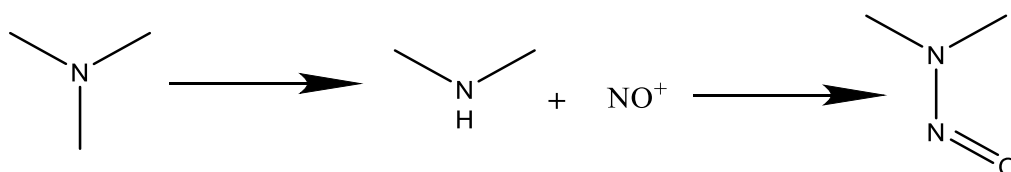


Figura 19. Reacción de nitrosación por desalquilación de aminas terciarias y posterior nitrosación.

- *Nitrosación con tiocianato de nitrosilo (81)*

El tiocianato de nitrosilo tiene propiedades similares al cloruro de nitrosilo.

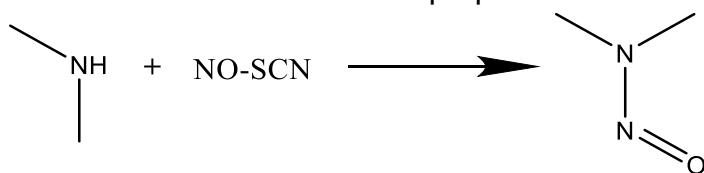


Figura 20. Reacción de nitrosación con tiocianato de nitrosilo

- *Nitrosación con S-nitrosotioles (82)*

Los S-tioles también conocidos como tionitritos pueden liberar el catión nitrosonio (NO^+) tras un tratamiento con ácido, dando lugar a la formación de N-nitrosaminas.

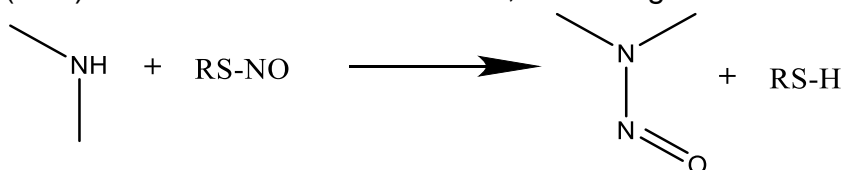


Figura 21. Reacción de nitrosación con S-nitrosotioles

- *Oxidación de hidrazinas 1,1-Disustituidas (76)*

Como agente oxidante puede actuar el di-*ter*-butilnitroxido, el tetranitrometano, el peróxido de hidrógeno y el ozono.

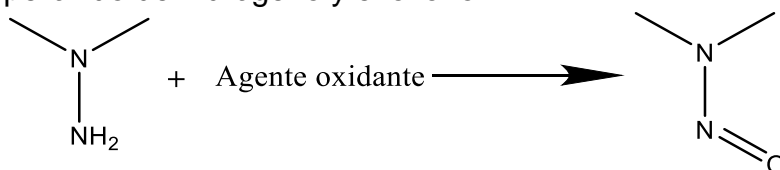


Figura 22. Reacción de nitrosación por oxidación de hidrazinas 1,1-disustituidas

- *Nitrosación por nitroso-transferencia (77)*

Una N-nitrosamina también puede actuar como un agente de nitrosación

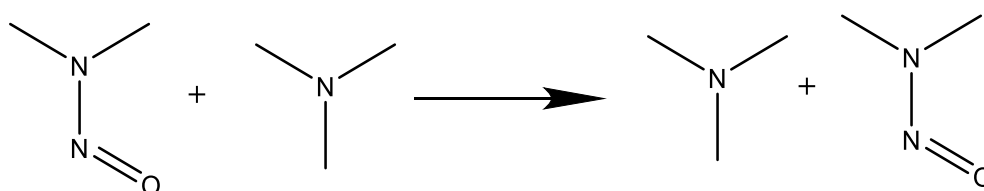


Figura 23. Reacción de nitrosación por transferencia del grupo nitroso

Acciones de las Agencias Regulatoras a nivel Internacional

En junio de 2018 se dio a conocer cuáles medicamentos, cuyo principio activo era el valsartán fabricado por la compañía Zhejiang Huahai Pharmaceuticals en Linhai, China, contenían impurezas de *N*-dimetilnitrosamina (NDMA). Dicha compañía era proveedora del principio activo a distintos fabricantes de medicamentos (30), provocando así un retiro de productos masivo en mercados internacionales. Esta impureza no pudo ser detectada por los métodos analíticos de rutina de la compañía y en primera instancia se asumió que su formación se llevó a cabo después de los cambios en los procesos de fabricación introducidos en 2012, produciendo así NDMA como producto secundario (31).

Las estimaciones preliminares señalaron que se podría presentar un caso de cáncer por cada 5000 pacientes que tomaron los medicamentos afectados a una dosis diaria por siete años de valsartán (320 mg), basado en los niveles de impurezas promedio detectados por Zhejiang Huahai Pharmaceuticals (60 ppm), estas estimaciones se extrapolaron a partir de estudios con animales y se asumió que la cantidad de NDMA presente en el principio activo era la misma en el producto terminado (32).

Después se dio a conocer que otra compañía llamada Zhejiang Tianyu también había detectado niveles de NDMA en el principio activo valsartán, del cual eran fabricantes, pero en niveles más bajos (33). Consecuentemente a ambas empresas, Zhejiang Huahai y Zhejiang Tianyu, se le retiraron las autorizaciones para fabricar el principio activo valsartán para medicamentos de la Unión Europea tras la suspensión de su "Certificate of Suitability" (CEP), un certificado que verifica la calidad y el cumplimiento de los requisitos europeos (34).

Estudios posteriores comenzaron a evaluar el impacto de la presencia de NDEA detectada en los procesos de fabricación de la empresa Zhejiang Huahai previo a los cambios producidos en 2012, los datos de los niveles de NDEA eran muy limitados (35).

Posteriormente, las autoridades alemanas detectaron bajos niveles de NDEA en otro principio activo, losartán, fabricado por Hetero Labs en India. Como resultado de esta detección, el 20 de septiembre de 2018, la revisión por parte de las autoridades sanitarias se extendió a otras cuatro sales de sartán, llamadas candesartán, irbesartán, losartán y olmesartán (36).

El valsartán, candesartán, irbesartán, losartán y olmesartán presentan una estructura de anillo (tetrazol) cuya síntesis podría conducir a la formación de impurezas como NDEA y NDMA (37).

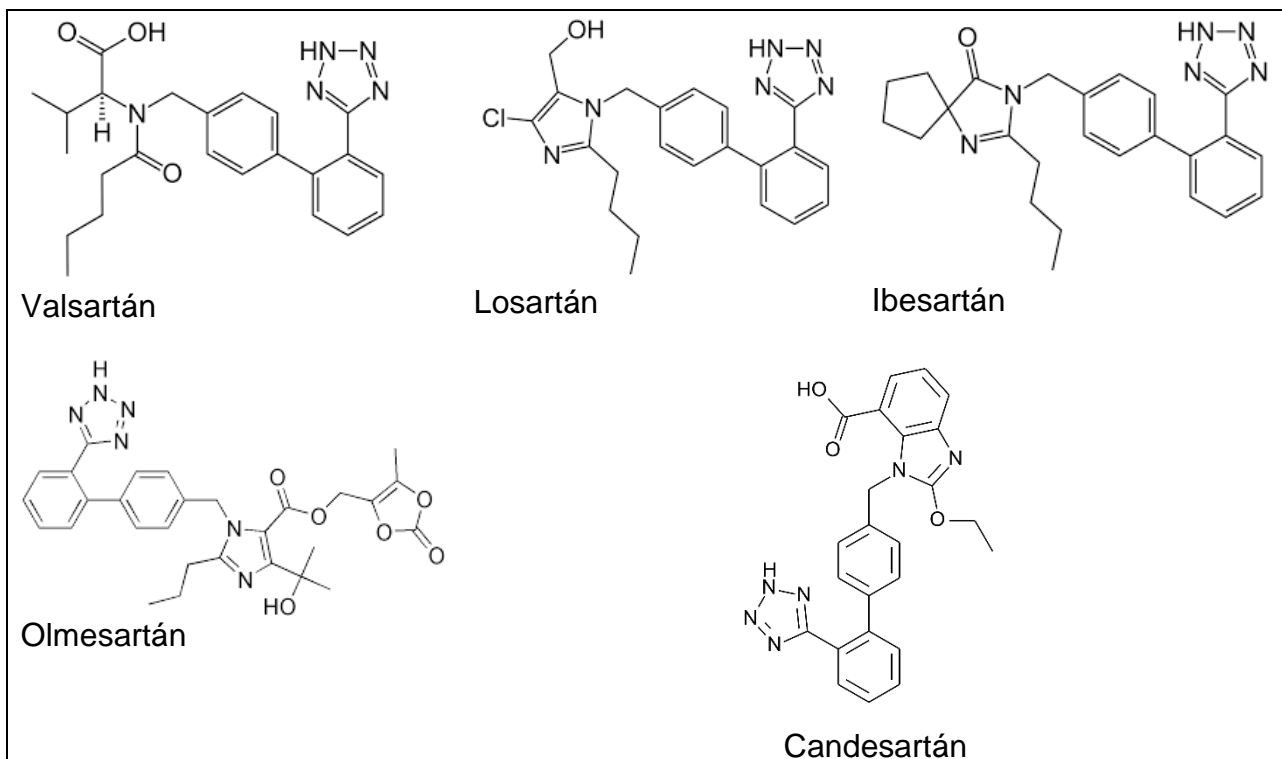


Figura 24. Estructuras de las sales de sartán con anillos de tetrazol

Autoridades europeas en colaboración con European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (EDQM) al realizar inspecciones a Zhejiang Huahai encontraron que no cumplía con “Good manufacturing practice” (GMP) en la manufactura de valsartán, encontrado deficiencias en la forma en la que la compañía investigaba la presencia de NDMA y NDEA en sus productos y como resultado de este incumplimiento se le fueron retiradas las autorizaciones para comercializar valsartán y sus intermediarios en la Unión Europea, (38). La FDA emitió una alerta para detener todas las sustancias activas producidas por Zhejiang Huahai en los Estados Unidos.

Posteriormente, una compañía india llamada Aurobindo Pharma encontró bajos niveles de NDEA en el principio activo irbesartán y consecuentemente el 8 de octubre de 2018 le fue suspendido el CEP a dicha compañía (39). Casi un mes después se detectó que la misma impureza estaba presente en lotes de valsartán manufacturados por Mylan Laboratories Limited en Hyderabad, India, suspendiéndoles así su CEP (40).

Después de una revisión con la información disponible se concluyó que si 100,000 pacientes tomaron el valsartán de Zhejiang Huahai (donde se encontraron los niveles más altos de impurezas) diariamente por 6 años a dosis altas, podría haber 22 casos de cáncer por NDMA, mientras que en las medicinas donde se encontró NDEA podría haber 8 casos en 100,000 pacientes tomando el medicamento a dosis altas por 4 años (41).

Si bien, el objetivo es no tener impurezas de nitrosaminas cuantificables, se establecieron límites provisionales de acuerdo con la ICH M7 (R1). Estos límites están basados en la ingesta diaria máxima de cada impureza derivado de estudios con animales: 96 ng para NDMA y 26.5 ng para NDEA, que, al dividirlos por la dosis máxima diaria de cada principio activo, se obtiene el límite en partes por millón (**Tabla 5**). Esta medida implementada tendría una duración de dos años, periodo en el cual las empresas deberán de realizar los cambios necesarios en el proceso de fabricación y establecer pruebas capaces de detectar cantidades más pequeñas de impurezas; después de este periodo, las compañías deberán demostrar que en sus productos la presencia de NDEA o NDMA se encuentra por debajo de 0.03 ppm (41).

Tabla 5. Límites temporales para las impurezas NDMA y NDEA.

Principio activo (dosis diaria máxima)	NDMA		NDEA	
	Ingesta diaria máxima (ng)	Límites (ppm)	Ingesta diaria máxima (ng)	Límites (ppm)
Candesartán (32 mg)	96.0	3.000	26.5	0.820
Irbesartán (300 mg)	96.0	0.320	26.5	0.088
Losartán (150 mg)	96.0	0.640	26.5	0.177
Olmesartán (40 mg)	96.0	2.400	26.5	0.663
Valsartán (320 mg)	96.0	0.300	26.5	0.082

Estas impurezas se pudieron haber formado durante el proceso de síntesis en la formación del anillo de tetrazol bajo ciertas condiciones y usando ciertos disolventes y reactivos.

NDMA

Para su formación, es importante la presencia de una amina secundaria (DMA), como posible ruta se plantea la descomposición de dimetilformamida (DMF) a altas temperaturas a DMA (42).

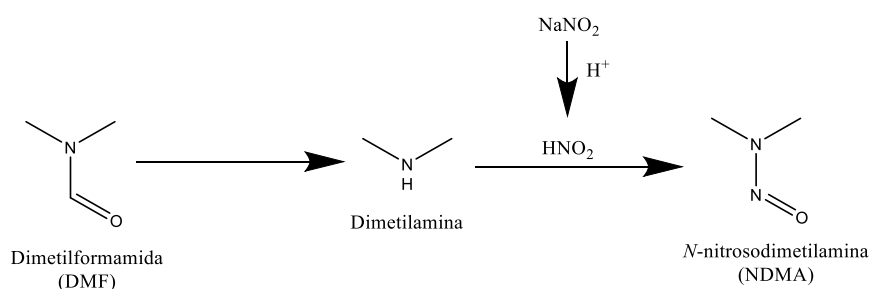


Figura 25. Reacción general para la formación de NDMA a partir de dimetilformamida

Se plantea como posibilidad la presencia de DMA como impureza en la DMF ya que es utilizada como precursor en la industria en el proceso de síntesis de DMF, también puede ser un producto de degradación formado durante el almacenamiento de este disolvente.

NDEA

Esta impureza se puede generar a partir de dietilamina (DEA) por analogía con la formación de NDMA a partir de DMA (42).

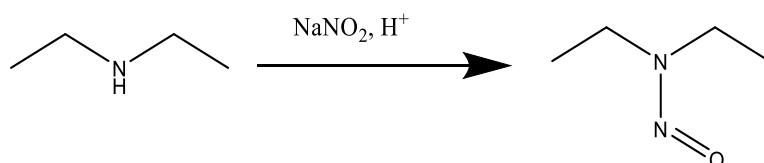


Figura 26. Reacción general para la formación de NDEA a partir de dietilamina

Análogo a la formación de DMA, se plantea la formación de DEA por degradación de trietilamina (TEA) o como impureza en materia prima para síntesis de TEA.

La nitrosación directa de TEA puede ocurrir a través de un ion nitrosonio, lo que da como resultado la generación de un aldehído y una amina secundaria que reacciona con más ácido nitroso para formar una nitrosamina.

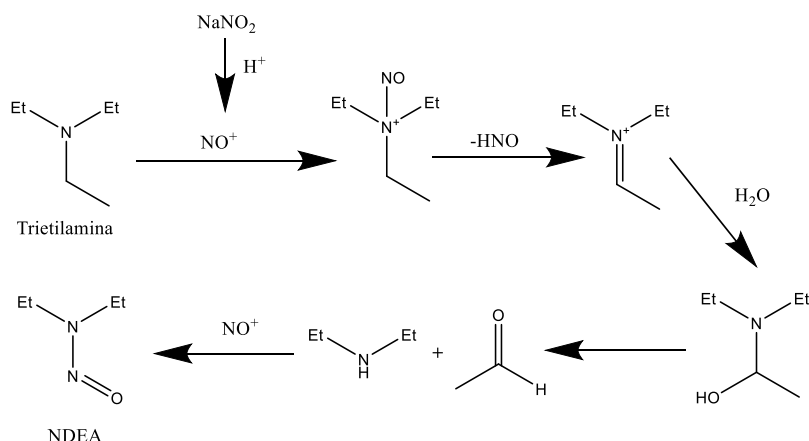


Figura 27. Mecanismo de formación de NDEA partiendo de TEA a DEA

En septiembre de 2019, la presencia de NDMA se notificó en ranitidina, tanto en el fármaco como en el producto terminado con niveles preocupantes de acuerdo con los principios de la guía ICH M7 (R1), encima de los que se establecieron durante el análisis del caso de las sales de sartán. Basada en su estructura se determinó que la NDMA podría generarse por la degradación del fármaco en presencia de nitritos bajo ciertas condiciones; o bien, en el proceso de manufactura el nitrito

podría introducirse durante la síntesis del fármaco o a través de algunos excipientes. Los primeros hallazgos sugirieron que bajo ciertas condiciones la dimetilamina (DMA) de la ranitidina expuesta a una fuente de nitrito (por ejemplo, nitrito de sodio) podría formar NDMA (43). Meses después, en abril de 2020, el comité de medicinas para humanos de la EMA (CHMP por sus siglas en inglés) recomendó la suspensión de todas las medicinas que tuvieran en su formulación ranitidina (44) y en septiembre del mismo año colocó una excepción a aquellas formas farmacéuticas que son administradas por inyección o infusión (45). Por su parte, la autoridad sanitaria de los EUA, la FDA (Administración de medicamentos y alimentos), solicitó el retiro del mercado de todos los productos farmacéuticos de prescripción y OTC que contuvieran ranitidina, además, también efectuó algunos retiros de nizatidina, un medicamento que se encuentra en la misma familia de la ranitidina.

En diciembre de 2019, se notificó la presencia de trazas de NDMA en algunos lotes de metformina. Sin embargo, los niveles encontrados estaban por debajo de los establecidos, por tal motivo, este medicamento no fue retirado de la Unión Europea (46). Por otro lado, la FDA si ejecutó algunos retiros de mercado de diversas compañías, siendo que, hasta el momento aún se están llevando a cabo.

Ambas agencias sanitarias emitieron guías de orientación para los titulares autorizados de comercialización para hacer frente a este problema.

En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), emitió en julio de 2018 un comunicado a la población, informando sobre la inmovilización y no comercialización de los medicamentos cuya materia prima contuviera valsartán del fabricante Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co. Ltd (64). Y posteriormente en octubre de 2019 publicó un aviso preventivo en el que se solicitó la suspensión total del uso y comercialización de productos farmacéuticos en cuya composición contuviera el principio activo ranitidina.

DISCUSIÓN

Clasificación de carcinogenicidad de acuerdo a la OMS

La IARC (OMS) clasifica la carcinogenicidad de los compuestos o factores físicos en cuatro grupos:

-Grupo 1: “Carcinogénicos para el ser humano”, hay pruebas suficientes que confirman que puede causar cáncer a los humanos.

-Grupo 2A: “Probablemente carcinogénico para el ser humano”, hay pruebas suficientes de que puede causar cáncer a los humanos, pero actualmente no son concluyentes.

-Grupo 2B: “Posiblemente carcinogénico para el ser humano”, hay algunas pruebas de que puede causar cáncer a los humanos, pero de momento están lejos de ser concluyentes.

-Grupo 3: “No puede ser clasificado respecto a su carcinogenicidad para el ser humano”, actualmente no hay ninguna prueba de que cause cáncer a los humanos.

-Grupo 4: “Probablemente no carcinógeno para el ser humano”, hay pruebas suficientes de que no causa cáncer a los humanos

Compuestos del grupo de las nitrosaminas como la NDMA y NDEA están clasificados en el grupo 2A.

Mientras que NMEA (N-metiletilnitrosamina), NDELA (N-dietanolnitrosamina), NDMA (N-dibutilnitrosamina), NPIP (N-nitrosopiperidinitrosa), NPYR (N-nitrosopirrolidina), NMOR (N-nitrosomorfolina) y NSAR (N-nitrososarcosina) están clasificadas en el grupo 2B.

Esta clasificación se realiza con base en la evidencia científica existente sobre la carcinogénesis de los compuestos.

Una gran cantidad de evidencia hace referencia a la NDMA, ya que fue el primer compuesto estudiado al cual se le demostró en primera instancia la capacidad de producir graves necrosis centrilobulares hepáticas en ratas, ratones, conejos, cobayos y perros, siendo todas estas especies susceptibles a la NDMA. Las muertes en un corto periodo de tiempo sugieren que la NDMA tiene una acción rápida, esto está más acentuado en los conejos debido a que la proteína involucrada en el proceso metabólico (CYP2E1) es altamente eficiente en la catálisis del metabolismo de la NDMA (47), por lo que una eficaz conversión de NDMA a α -hidroxinitrosamina provocará una mayor formación del ion diazonio responsable del daño al tejido animal.

Carcinogénesis

Estas observaciones permitieron definir las concentraciones necesarias para poder llevar a cabo un análisis de intoxicación crónica, mostrando así los primeros resultados obtenidos en la observación de formación de tumores en ratas. Los tumores primarios encontrados estaban situados en hígado ya que las enzimas microsomales responsables de la activación metabólica se encuentran principalmente en este órgano, actuando así, mayoritariamente en el órgano en el

cual son activadas, además, la alta reactividad de los metabolitos activados (diazalcanos) evita una distribución eficaz hacia otros tejidos.

Estos dos estudios fueron el detonante que motivó a más científicos a extender las investigaciones a otros compuestos *N*-nitrosos en distintas especies animales, observando así que la actividad carcinogénica no era exclusiva de NDMA sino también de otros compuestos de la misma familia. Siendo la *N*, *N*-dietilnitrosamina (NDEA) junto con la NDMA las sustancias con una mayor capacidad de promover el desarrollo de tumores en distintos órganos, principalmente hígado. El desarrollo de tumores en senos nasales ocurría cuando la administración se daba por inhalación, alimentación o aplicación en piel.

En investigaciones donde se estudia el carcinoma hepatocelular, el uso de dietilnitrosamina es recomendado para inducir la formación de tumores ya que genera un desorden de las células hepáticas normales con intensa necrosis centrilobular en el hígado intoxicado con DEN, pero también se sugiere el uso de ratones macho (21, 49) ya que el carcinoma hepatocelular tiene una incidencia cuatro veces mayor en humanos y ratones macho que en hembras, esto puede atribuirse a las diferencias en las enzimas metabolizadoras de los carcinógenos. Además de que se observó que cuando al animal se le realizaba una orquidectomía, es decir, se eliminaba la fuente de testosterona y eran suplementados con estrógeno, la incidencia de tumores reducía al mínimo, esto indica un papel negativo del estrógeno en la tumorigénesis, esta evidencia fue apoyada cuando a ratones hembras que fueron ovariectomizadas tuvieron un mayor crecimiento de tumores en comparación con aquellos a los que no se les realizó esta operación y cuando se les trataba con testosterona, la incidencia del tumor se convirtió en un 100% en los ratones hembra, lo que confirma que la testosterona es un potenciador en el crecimiento de los tumores hepáticos (22).

Teratogénesis

Con respecto a la teratogenicidad, la NDMA y NDEA obtuvieron resultados negativos en la formación de tumores en fetos sugiriendo que la activación metabólica que las nitrosaminas necesitan, no se lleva a cabo en los tejidos embrionarios. Al parecer, el proceso metabólico pertinente comienza a desarrollarse hasta los últimos días de gestación; pero compuestos como metilnitrosourea y etilnitrosourea fueron aquellos que mostraron ser capaces de inducir apoptosis y detener el crecimiento de órganos y tejidos fetales inmediatamente después de ser administrado, pudiendo causar metilaciones y etilaciones en cualquier átomo de oxígeno y nitrógeno del ADN, produciendo una gran cantidad de alquilfosfotriésteres. Estos compuestos pertenecen al grupo de las alquilnitrosoureas y son capaces de atravesar con facilidad la barrera hematoencefálica y placentaria, induciendo así, una amplia variedad de tumoraciones al ser administrada en un periodo precoz del desarrollo embrionario, estos agentes alquilantes no requieren de activación enzimática para desarrollar su toxicidad, puesto que pueden reaccionar con agua o con grupos sulfhidrilo o amino, conduciendo a la formación de reactivos electrofílicos (iones monoalquildiazonio)

que son sustancias intermediarias alquilantes en numerosos lugares nucleofílicos en las células diana (48).

Alteraciones enzimáticas y hormonales

La SGPT (transaminasa glutámico-pirúvica sérica), mejor conocida como ALT (alanina aminotransferasa), es una enzima intracelular que se encuentra principalmente en el hígado, una concentración alta de SGPT liberada a la sangre puede ser un signo de daño en el hígado, lesión hepática por destrucción de hepatocitos (citólisis), cáncer u otras enfermedades (67). Cuando ratones albinos suizos fueron tratados con dietilnitrosamina a una dosis de 20 mg/kg, los valores de esta enzima en suero se elevaron significativamente en comparación con el grupo control, lo que sugiere daño en los hepatocitos causado por el compuesto *N*-nitroso (23). Lo mismo ocurrió con la enzima SGOT (transaminasa glutámico-oxalacética sérica), también conocida como AST (aspartato aminotransferasa) (67). Por su parte, la catalasa (peróxido de hidrógeno oxidorreductasa) como parte del sistema antioxidante, es una de las enzimas de gran abundancia y distribución en el organismo, con mayor actividad en hígado y riñones, localizada en la mitocondria y peroxisomas, excepto en eritrocitos, donde se encuentra en el citosol (68). Se ha observado que las alteraciones que presenta esta enzima no se comportan de igual forma en todos los tejidos, por ejemplo, en pacientes con insuficiencia renal crónica, se han encontrado disminuciones de las enzimas antioxidantes a nivel eritrocitario (50). También existen reportes en los que en tejido canceroso, los niveles de expresión de esta enzima se elevan (51), posiblemente por el incremento del desbalance oxidativo provocado por un aumento en la producción de radicales libres (52), esto puede explicar el aumento significativo en los valores de catalasa en el grupo tratado que se muestran en comparación con el grupo control. Otra enzima que forma parte de los sistemas antioxidantes enzimáticos es la glutatión peroxidasa (GPx), al igual que la catalasa se encarga de eliminar el H₂O₂ y su localización celular es similar, pero tienen mecanismos diferentes. Se ha observado que en células tumorales se produce un aumento en la actividad de la GPx (53), por razones similares explicadas en la catalasa, en ratones a los cuales se les administró dietilnitrosamina, los valores de GPx aumentan significativamente en comparación con el grupo control, el aumento en los niveles de expresión de estas dos enzimas antioxidantes pueden indicar que existe una respuesta al estrés oxidativo en las células del tejido. Las glutatión-S-transferasas (GST), son un grupo de enzimas que catalizan las reacciones de conjugación de la forma reducida de glutatión (GSH) a sustratos xenobióticos (69). Se ha observado un papel importante de GST en el desarrollo del cáncer, principalmente la forma GSTP, donde se presenta una sobreexpresión de esta enzima y esta relación parte del hecho de que el fenotipo transformado de las células tumorales está asociado con vías de señalización de quinasa reguladas de manera aberrante y con la adición celular a las proteínas sobreexpresadas. (54). Además, el compuesto *N*-nitroso que aumenta la actividad de GST en ratones macho es la dietilnitrosamina (55), esto concuerda con el pronunciado aumento de esta enzima en el hígado en presencia del compuesto *N*-nitroso en comparación con el grupo control (23).

La medición de marcadores enzimáticos en hígado de conejos macho, después de ser tratados durante 12 semanas obtuvo resultados diferentes a los anteriores. Los niveles y actividad de glutatión (GSH) de los grupos a los cuales se les administró MEN, NDEA, NDMA y DPN presentaron disminución significativa en comparación con el grupo control, esto se interpretó como un agotamiento en los niveles de GSH, es decir, los altos niveles de estrés oxidativo provocan consecuentemente una caída de las enzimas antioxidantes (13). Es importante mencionar, que el conejo es una especie que ha demostrado ser más susceptible debido a la alta eficiencia de metabolismo de compuestos *N*-nitrosos, aunado al hecho de que este ensayo tuvo una duración tres veces mayor a aquella que se discutió anteriormente con el uso de ratones, la cual solo duró cuatro semanas, esto sugiere que en las condiciones de término del ensayo en conejos, el daño provocado por el estrés oxidativo llegó a tal punto de saturación que llevaron a un agotamiento en los niveles enzimáticos, sugiriendo así que todas las nitrosaminas evaluadas en ese ensayo, fueron capaces de inhibir la actividad de enzimas antioxidantes para superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa, respectivamente (13).

La biosíntesis de las hormonas esteroideas está controlada por la actividad de varias enzimas del citocromo P450 altamente selectivas de sustratos y varias deshidrogenasas y reductasas esteroideas, en particular la enzima aromatasa (CYP19A1), la enzima que convierte los andrógenos en estrógenos. En el estudio, las nitrosaminas NDEA, NDMA y DPN disminuyeron potencialmente los niveles de testosterona en el plasma de los conejos después de 1, 4, 8, y 12 semanas de tratamiento (13). Por otro lado, las nitrosaminas MEN, NDEA, NDMA y DPN aumentaron significativamente los niveles de estrógeno después de 1 y 8 semanas de tratamiento, mientras que el DEN los disminuyó después de 4 y 12 semanas de tratamiento (13). El último paso de la síntesis de esteroideos y su metabolismo primario es catalizado por la 17 β -hidroxiesteroideas deshidrogenasas (17 β -HSD), que se expresa exclusivamente en los testículos. Por lo tanto, se sugiere que la disminución de los niveles de testosterona fue ocasionada principalmente a la inhibición de esta enzima (13).

Se han realizado otros estudios para evaluar marcadores enzimáticos en riñón; el malondialdehído (MDA) es un biomarcador de peroxidación lipídica, generado en situaciones de estrés oxidativo, ha sido utilizado frecuentemente para medir en plasma el daño oxidativo a lípidos por su potencial aterogénico, su vida media y alta reactividad le permite actuar tanto en el interior como en el exterior de las células interactuando con proteínas y ADN implicado en diferentes procesos fisiopatológicos (14). Este biomarcador aumentó significativamente en comparación con el grupo control en ratas macho, por lo tanto se puede sugerir que la administración de nitrosaminas genera un daño oxidativo a lípidos a nivel riñón. Por el contrario, la capacidad de reducción férrica del plasma (FRAP) es un ensayo utilizado para medir la capacidad antioxidante (70), donde la administración de nitrosaminas en ratas reduce la capacidad antioxidante de la especie. Otra de las pruebas que se realiza con el fin de evaluar el funcionamiento del riñón es la llamada nitrógeno ureico en sangre (BUN), la cual mide la cantidad de nitrógeno ureico, este es un producto de desecho que los riñones se encargan de retirar, pero un mal

funcionamiento de estos podría sugerirse si se observa un aumento en los niveles de BUN (71), donde existe un aumento pronunciado de BUN en el grupo al cual le fue administrado la nitrosamina, lo que indica que este compuesto también es capaz de llevar la afección a distintos órganos más allá de hígado. Al igual que BUN, la creatinina es un desecho que debe ser filtrado por los riñones y mal funcionamiento sugiere un aumento en los niveles de creatinina (72). De tal forma que dado que el riñón es un órgano susceptible a daño causado por estrés oxidante, las alteraciones causadas por el uso de nitrosaminas en ratas son evidentes no solo a nivel de hígado, sino también en riñón (14).

Uso de nano puntos de carbono en ADN como metodología de detección

El uso de nueva tecnología nos permite mejorar los límites de detección, tal es el caso de los nano puntos de carbono en el ADN (ADN Carbon-Nanodots), la efectividad de este método se debe a que la guanina es electroquímicamente activa y en presencia de NDMA la guanina se modifica a 6-Ometilguanina o 7-metil guanina y con NDEA modificando guanina a 8-oxoguanina para formar aductos de ADN, estos aductos que se forman son electroquímicamente activos, lo que en última instancia lleva a un aumento de la corriente máxima en el DPV (25), esta técnica además de mejorar su detección, nos permite confirmar la mutagenicidad de estos compuestos *N*-nitrosos, así como incorporar el aducto 8-oxoguanina, ya que esta no había sido observada, o bien, su formación con respecto a las lesiones predominantes es en menor proporción.

Productos farmacéuticos como precursores de reacción

Una vez confirmadas las distintas formas de daño que pueden causar diversos compuestos *N*-nitrosos, el estudio de su presencia y formación se hizo evidente, en primera instancia, la dimetilamina (DMA) era conocida como el principal precursor de la NDMA (73). Sin embargo, después comenzó a confirmarse que, compuestos que tenían en su estructura aminas terciarias con grupos funcionales como dimetilamina o dietilamina también eran capaces de actuar como precursores en las reacciones de formación de compuestos *N*-nitrosos como NDMA y NDEA, respectivamente (26). Las primeras condiciones experimentales dentro de las cuales se realizaron los estudios por ser de interés ambiental y partiendo de la premisa de que el agua consumida por los humanos pudiera contener las condiciones necesarias para llevar a cabo una reacción de conversión eficiente (26), planteaban una diferencia en las cantidades de cloramina. La condición MFP conteniendo 28.4 mg/L mientras que la SDS 2.5 mg/L. Sin embargo, esta diferencia entre ambas condiciones experimentales, no influyó significativamente en el rendimiento de conversión, por lo tanto, aunque la cantidad relativa de cloramina fue muy superior en la condición MFP con respecto a la SDS (28.4 mg/L frente a 2.5 mg/L), la reacción no se vio limitada por la disponibilidad de cloramina, pudiendo lograr reacciones completas en las condiciones de SDS, también indica que los productos farmacéuticos ahí estudiados son capaces de formar NDMA en las condiciones prácticas de desinfección con cloramina.

La cloramina puede ser encontrada en las aguas que son tratadas para desinfección en procesos de potabilización, por lo tanto una de las evaluaciones realizadas fue aquella donde se busca analizar la diferencia de los rendimientos de conversión de productos farmacéuticos a NDMA o NDEA entre el uso de agua Mill-Q y agua de grifo, para de esta forma evaluar si las trazas de compuestos que tiene el agua de grifo pueden provocar una diferencia en los rendimientos (26). Se observó que los rendimientos de conversión no dependen del agua que se utilice.

Además, la ranitidina tuvo el rendimiento de conversión más alto (89.9-94.2%), seguido por doxilamina (8.0-9.7%).

Influencia de la estructura de los precursores

La cloramina es un compuesto utilizado para la desinfección, por lo tanto, se puede encontrar a nivel de trazas en aguas potabilizadas; la presencia de este compuesto y una fuente de dimetilamina (DMA) o dietilamina (DEA), pueden llevar a cabo una reacción en la que se transfiere el cloro de la cloramina al átomo de nitrógeno en las aminas terciarias, pero debido a que es una sustitución de cloro electrofílico, la naturaleza del resto de la estructura de los compuestos farmacéuticos puede influir en la velocidad de reacción y por lo tanto afectar la conversión molar. En general, un grupo donador de electrones (EDG) cercano al grupo DMA/DEA puede aumentar la densidad de electrones en el átomo de nitrógeno y así ayudan a atraer el cloro; mientras que un grupo de extractor de electrones (EWG) puede disminuir la densidad de los electrones y ralentizar la reacción. Además, la reactividad también puede verse afectada por el obstáculo estérico entre el EDG/EWG (es decir, la estructura del compuesto farmacéutico) y el electrófilo (es decir, el cloro) (27).

La ranitidina y nizatidina son compuestos antihistamínicos H₂ con estructuras similares, conteniendo una dimetilamina en el C2 de su anillo heterocíclico. A pesar de su similitud estructural, la ranitidina tuvo una conversión mayor que la nizatidina, esto se debe a que el C2 en el anillo furano de la ranitidina es un sitio electrofílico fuerte debido al efecto de donación de electrones del heteroátomo de oxígeno, mientras que el C2 en el anillo tiazol de la nizatidina es un sitio nucleófilo ligero debido a los efectos combinados de los átomos de nitrógeno y de azufre.

Para el caso del sumatriptán y el diltiazem, estos compuestos tienen la DMA unida a una estructura de indol y benzotiazepina que dona electrones, respectivamente; sin embargo, hay dos carbonos entre el EDG y el grupo de la DMA, lo que debilita los efectos de la donación de electrones.

En cuanto a los tres antihistamínicos H₁ estructuralmente similares (carbinoxamina, clorfenamina y doxilamina), todos ellos tienen el sistema aromático voluminoso rico en electrones en sus estructuras, pero la distancia entre la estructura aromática y el grupo DMA es mayor que la de la ranitidina, lo que da lugar a las conversiones molares inferiores generales.

Para el resto de los compuestos que muestran bajas conversiones molares, la lidocaína y el DEET tienen una DEA unida a un grupo carbonilo que retira electrones, y por lo tanto ambos mostraron rendimientos muy bajos de NDEA. Se observa una estructura similar para la metformina, que tiene el grupo DMA unido a una biguanida que retira electrones. La amitriptilina y el escitalopram tienen una larga cadena de alquilo de carbono entre el grupo DMA y el voluminoso aromático y esto debilita el efecto de donación de electrones. En el caso del tramadol, la venlafaxina y los cuatro antibióticos macrólidos (azitromicina, claritromicina, eritromicina y roxitromicina), tienen complicadas estructuras estéricas que cierran el grupo DMA, que puede dificultar la reacción de transferencia de cloro.

Papel del pH en la reacción de formación

Otros estudios enfocaron su investigación en el efecto del pH para la formación de NDMA tras la cloraminación de dos productos farmacéuticos: ranitidina y sumatriptán, obteniendo así una conversión máxima de NDMA a un pH medio (pH 7 para la ranitidina y pH 8 para el sumatriptán). También se observó que la fase inicial de retardo (Lag) se redujo y la constante de velocidad de reacción (k) se incrementó a medida que aumentaba el pH, lo que indicaba que se estaban produciendo reacciones más rápidas a valores de pH más altos (27).

Por lo tanto, existen dos factores principales que determinan la tasa y el rendimiento de la formación de NDMA:

- La forma del precursor (es decir, aminas protonadas o no, pKa-pH relevante) y
- Las especies de cloramina presentes (es decir, la monocloramina o dicloramina).

La reacción de formación de NDMA se puede describir como un ataque electrofílico en el átomo de nitrógeno del grupo de las aminas, por lo que las aminas no protonadas se verán favorecidas en la reacción. La ranitidina tiene un pKa de 8,2 y el sumatriptán tiene un pKa de 9.6 para el grupo de las aminas terciarias, por lo que las formas no protonadas de las aminas estarían presentes en concentraciones más importantes en pH más básicos, esto puede explicar el menor porcentaje de NDMA formado a pH ácido, así como la iniciación más rápida de la reacción observada en los valores de pH más altos. Se ha observado que la dicloramina aumenta considerablemente la formación de NDMA en comparación con la monocloramina (56); la monocloramina es dominante en pH neutro y básico, mientras que se formaba más dicloramina en el pH ácido. Por lo tanto, aunque la amina no protonada es dominante a un pH más alto, se espera que la conversión final de NDMA sea menor debido a la falta de dicloramina. La máxima conversión molar de NDMA se produjo a un pH de 7 para ranitidina y pH 8 para el sumatriptán, que son aproximadamente 1.2 y 1.6 unidades más bajas que sus respectivos valores pKa. El porcentaje de aminas no protonadas aumenta conforme va aumentando el pH, sin embargo, una baja conversión de NDMA a un pH básico se asoció con una falta de dicloramina, y, por el contrario, aunque hay más dicloramina disponible en el ácido pH, la conversión de NDMA se limita debido a la baja concentración de grupos

de aminas no protonadas, así que el impacto del pH en las especies involucradas en la reacción se puede esquematizar de la siguiente manera.

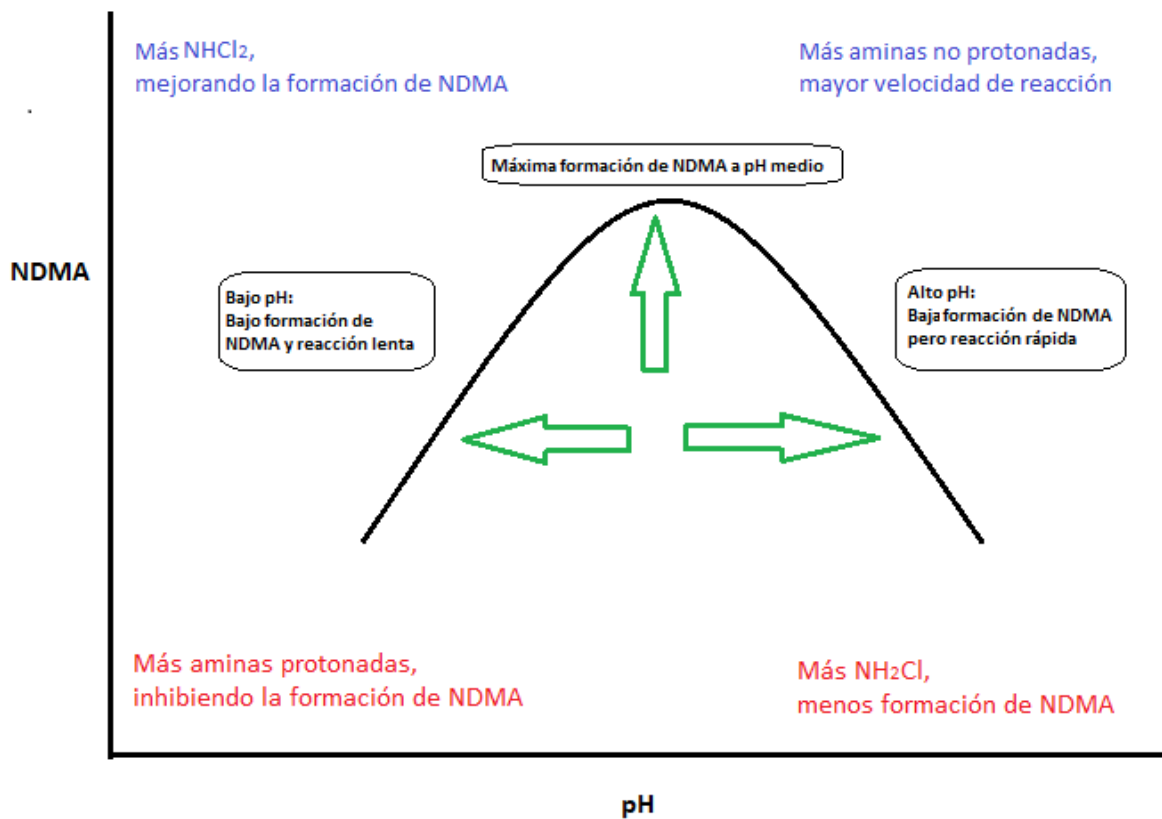


Figura 28. Esquematización del impacto del pH en las especies precursoras y las especies de cloramina en la formación de NDMA (27).

A un pH bajo, la formación de NDMA será poca y lenta ya que a pesar de haber más NH_4Cl , habrá una mayor cantidad de aminas protonadas que inhibirán la reacción de formación. A un pH alto, la formación de NDMA será rápida pero poca ya que a pesar de que la mayoría de las aminas no estarán protonadas, la cantidad de NH_2Cl aumentará, disminuyendo así la formación de NDMA, por lo tanto, la máxima formación de NDMA se dará a un pH que quede entre estos dos parámetros.

Comparación entre monocloraminas y dicloraminas

Otros estudios han mostrado las diferencias de rendimiento de conversión entre tres desinfectantes utilizados comúnmente, cloro libre, dióxido de cloro y cloramina, aquel que presenta mejores rendimientos de conversión de NDMA a partir de fármacos con dimetilaminas en su estructura (28), es la cloramina aquella que tiene porcentajes mayores de conversión (16-18%), sin embargo, como se mencionó anteriormente, cuando la cloramina es comparada con la dicloramina, esta última es la que tiene mejores rendimientos, es por eso que, otro estudio, con el fin de evaluar las diferencias de los rendimientos de conversión entre especies de cloraminas, utilizó dimetilamina (DMA) y cuatro aminas terciarias, trimetilamina, *N,N*-dimetilisopropilamina, *N,N*-dimetilbenzilamina y ranitidina (TMA, DMiPA, DMBzA y Ranitidina, respectivamente) en cuatro condiciones de cloraminación diferentes: FP, SDS con mono y dicloramina, SDS con monocloramina (en presencia de un exceso de amoníaco) y SDS con dicloramina.

Las tasas de formación de NDMA para la DMA, la TMA y la DMiPA se vieron significativamente afectadas por las concentraciones de dicloramina, siendo así que los mayores rendimientos de NDMA se observaron en la SDS con dicloramina y FP, es decir, en donde había más dicloramina presente (29). Por otro lado, las tasas de formación de NDMA para DMBzA y ranitidina mostraron patrones muy similares tanto en las pruebas de FP como en las de SDS, logrando rendimientos ligeramente superiores en las condiciones de FP (29). En ausencia de dicloramina, es decir, formación de dicloramina suprimida por el exceso de amoníaco (SDS con monocloramina), se formó una cantidad considerable de NDMA a partir de DMBzA y ranitidina, lo que sugiere que la monocloramina también puede reaccionar con estas aminas para formar NDMA. Sin embargo, la formación fue más lenta que la de la dicloramina. Curiosamente, bajo SDS con dicloramina, el NDMA se formó muy rápido a partir de DMBzA y ranitidina. Las tasas de formación fueron comparables a las de las pruebas de FP, lo que indica que las tasas de reacción de la dicloramina con cualquier amina los precursores son siempre más rápidos que los de la monocloramina, y sólo algunos precursores de aminas (como DBMzA y ranitidina) también pueden reaccionar con la monocloramina para formar NDMA con diferentes velocidades de reacción. La dicloramina es una especie más reactiva para formar NDMA a partir de precursores de aminas terciarias; sin embargo, el NDMA también puede formarse a partir de las reacciones con la monocloramina dependiendo de la estructura del precursor.

La mayor reactividad de la dicloramina para formar NDMA puede ser atribuido a una carga parcial positiva en el átomo de nitrógeno debido a dos átomos de cloro vecinos que el de la monocloramina con sólo un cloro. El átomo de nitrógeno de las aminas terciarias siempre será parcialmente negativo debido a dos los metilos funcionales de grupos vecinos. Por lo tanto, durante una sustitución nucleófila, la unión entre los átomos de nitrógeno de la amina y la dicloramina se formaría primero debido a una carga parcialmente más positiva en el nitrógeno de dicloramina.

Procesos de nitrosación

Sin embargo, la formación de compuestos *N*-nitrosos no sólo está relacionada con reacciones de cloraminación, estos también pueden formarse en un medio ácido con la presencia de especies nitrosantes y aminas nitrosables. Esta reacción puede llevarse a cabo dentro del organismo por nitrosación química en el estómago a través de una catálisis ácida o bien, por nitrosación microbológica a través de la actividad enzimática del microbiota.

Cabe señalar que, aunque dentro de los compuestos *N*-nitrosos también se encuentran las *N*-nitrosamidas, estos son muy inestables, provocando que una conversión de dimetilformamida (DMF) a pesar de tener en su estructura una *N*-amida lleve a una *N*-nitrosamina.

La investigación de la causa de presencia de NDMA y NDEA en las sales de sartán arrojó que su formación se pudo llevar a cabo durante la síntesis del anillo de tetrazol presente en la estructura de algunos fármacos de este grupo, ya que el uso de DMF o TEA, como disolvente podía llevar a su descomposición en dimetilamina o dietilamina, respectivamente, que en presencia de ácidos nitrosos reaccionaría para formar NDMA y NDEA (37).

Por otro lado, en medicamentos como telmisartán, azilsartán y eprosartán en cuya estructura no cuentan con un anillo de tetrazol, autoridades sanitarias como EMA y FDA no han encontrado, hasta el momento, compuestos *N*-nitrosos.

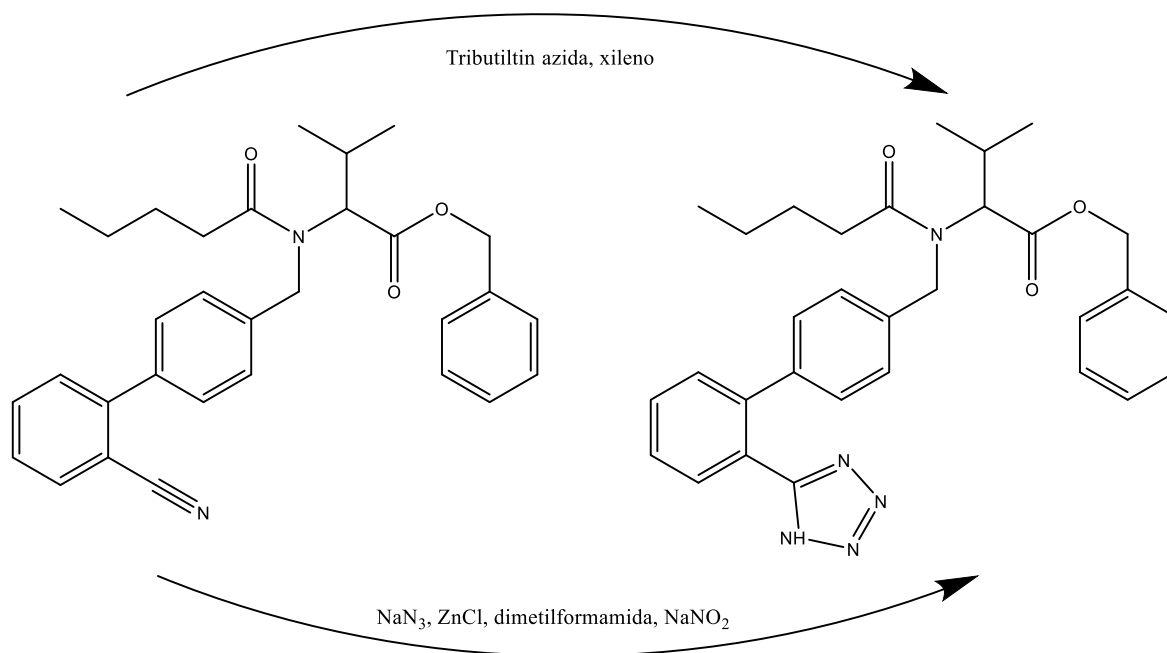


Figura 29. En la parte superior se muestran las condiciones de reacción para la formación del anillo de tetrazol en las cuales no se ha observado formación de nitrosaminas, mientras que en la parte inferior se muestran las condiciones utilizadas que propiciaron la formación de estos compuestos.

Cálculo de ingestas aceptables basadas en la evaluación de riesgo

La guía M7 (R1) de la ICH sobre la evaluación y el control de las impurezas reactivas del ADN (mutagénicas) en los productos farmacéuticos para limitar el posible riesgo cancerígeno, está enfocada en la identificación, categorización, calificación y control de las impurezas mutagénicas con alcance a nuevos productos farmacéuticos en desarrollo en su fase clínica, así como aquellos ya aprobados con presencia en el mercado. La síntesis de la sustancia activa de dichos productos deberá implicar el uso de reactivos químicos, disolventes y catalizadores; por lo que sustancias de origen biológico, biotecnológico, péptidos, oligonucleótidos, radiofarmacéuticos, productos de fermentación, herbales, de origen animal o vegetal quedan exentos de esta guía al igual que aquellos destinados al tratamiento de cáncer avanzado.

Derivado de los constantes avances en química analítica cada vez se detectan más sustancias en bajos niveles lo que provocará nuevos cuestionamientos sobre las consecuencias en la exposición humana teniendo así que realizar evaluaciones de riesgo, desarrollando métodos para calcular el impacto potencial en la salud humana y poder tomar decisiones informadas sobre la gestión de riesgos. Una herramienta válida para realizar esta evaluación es el uso del Umbral de Preocupación Toxicológica (TTC, por sus siglas en inglés) cuyo enfoque reúne datos sobre exposición, estructura química, metabolismo y toxicidad, por lo tanto, el uso de esta herramienta necesita del conocimiento de la estructura química de la sustancia en cuestión y de información sobre la exposición humana (57), se expresan normalmente como mg/kg de peso corporal.

Para poder llevar a cabo la evaluación de riesgo, esta guía clasifica las impurezas con respecto al potencial mutagénico y carcinogénico, de la siguiente forma.

Tabla 6. Clasificación de impurezas con respecto a su potencial mutagénico y carcinogénico (58)

Clase	Definición	Acciones para su control
1	Carcinógenos y mutagénicos conocidos	Control en el límite específico aceptable del compuesto.
2	Mutagénico conocido con potencial carcinogénico desconocido	Control por debajo de los límites aceptables (TCC apropiado)
3	Estructura de alerta, sin datos de mutagenicidad No relacionado con la estructura del fármaco	Control por debajo de los límites aceptables (TCC apropiado) Realizar ensayo de mutagenicidad bacteriana Si es mutagénico = Clase 2 Sino es mutagénico = Clase 5
4	Estructura de alerta, se ha comprobado que no son mutagénicos Relacionado con la estructura del fármaco o compuestos como intermediarios del proceso	Tratarlo como impureza no mutagénica

5	Sin alerta estructural o estructura de alerta con datos suficientes para demostrar la falta de mutagenicidad o carcinogenicidad	Tratarlo como impureza no mutagénica
----------	---	--------------------------------------

Esto permitirá llevar a cabo una caracterización del riesgo para derivar las ingestas aceptables de aquellas impurezas que pertenezcan a las clases 1, 2 y 3.

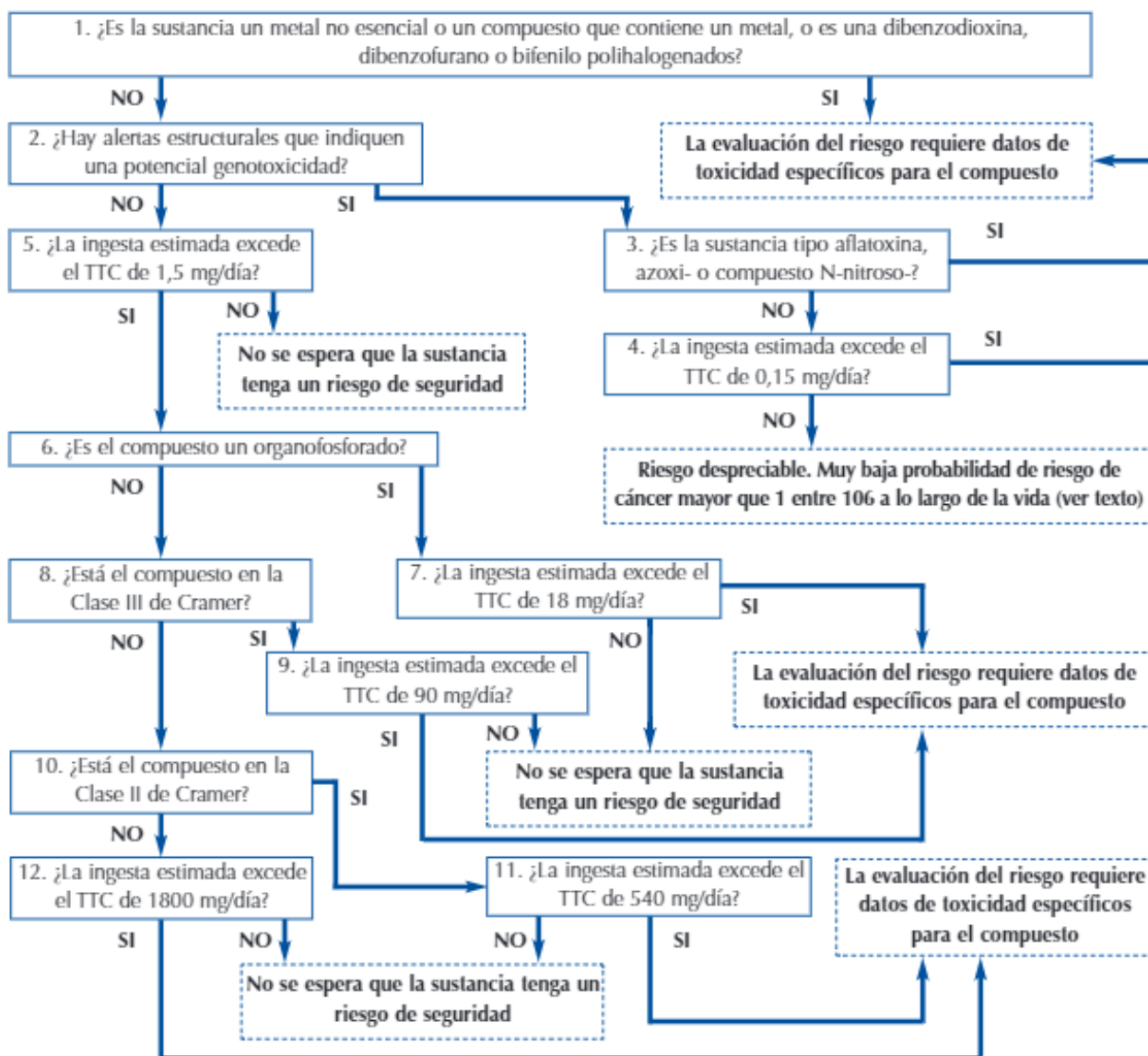


Figura 30. Árbol de decisión propuesto por ILSI Europa para evaluar si se puede utilizar el criterio TTC (59).

Para aquellas impurezas mutagénicas cuya ingesta aceptable está basada en el TTC se considera que una dosis de 1.5 µg por persona por día está asociada con un riesgo insignificante (riesgo de cáncer teórico de <1 en 100,000 a lo largo de toda una vida de exposición. Este enfoque se utiliza normalmente para las impurezas mutagénicas presentes en los productos farmacéuticos para el tratamiento a largo plazo (> 10 años) y cuando no se disponga de datos de carcinogenicidad (clase 2 y 3).

Sin embargo, nitrosaminas como NDMA y NDEA son conocidos mutagénicos y carcinogénicos, por lo que pertenecen a la clase 1, por tal motivo, la ingesta aceptable debe de estar basada en evaluaciones de riesgos específicos para el compuesto (32). El enfoque recomendado por ICH M7(R1) es el uso de la dosis que da una incidencia de tumor del 50% (TD₅₀) o la dosis Benchmark BMDL₁₀ (Benchmark Dose Lower Bound Confidence Limit), una estimación de la dosis más baja que es 95% segura de causar no más del 10% de incidencia de cáncer en roedores.

La TD₅₀ para NDMA reportada en la base de datos reconocida Carcinogenic Potency Database (CPDB) es 0.096 mg/kg/día (en la especie más sensible que es la rata) calculada como la media de todos los estudios positivos en ratas. La extrapolación al nivel de exceso de riesgo de cáncer se realiza por extrapolación lineal inversa a la dosis que teóricamente causa un riesgo de 1:100,000 dividiendo la TD₅₀ por 50,000 (50% o 0.5 x 100,000). Para el NDMA esto se traduce en una dosis de 1.92 ng/kg/día. Para una persona con un peso corporal de 50 kg esto resultaría en un nivel de ingesta aceptable de 96 ng/día (50 x 1.92 ng) lo cual corresponde a 0.3 ppm en una tableta de 320 mg de valsartán. Esta última operación se realiza para cada uno de los principios activos en cuestión con el fin de obtener los límites en cada producto farmacéutico (41).

Según la regla de Haber, un principio fundamental de la toxicología generalmente aceptada para ser utilizado en los carcinógenos mutagénicos y por lo tanto considerado apropiado para el NDMA, la dosis total tomada a lo largo del tiempo (dosis x tiempo) produce un nivel fijo de efecto, determinando así el riesgo asociado a la exposición. Aplicando este principio, la dosis acumulada aceptable durante toda la vida es entonces la ingesta aceptable multiplicada por los días de una vida (70 años es generalmente aceptado para esto) de 25,550 días. El uso de la ingesta aceptable calculada a partir de la TD₅₀, es decir, 96 ng/día, da como resultado una dosis aceptable de por vida asociada a un riesgo de cáncer adicional de 1:100,000 de 2453 µg.

Como la duración máxima de la exposición a la NDMA por el valsartán contaminado es de 6 años o 2190 días, la ingesta aceptable de 6 años puede calcularse dividiendo por 2190, lo que resulta en 1.12 µg/día como ingesta aceptable en 6 años. Duplicando esta ingesta se duplica el riesgo de 1:100,000 a 1:50,000 y así sucesivamente.

El enfoque basado en la TD_{50} se utilizó por primera vez para determinar los niveles de acción reglamentaria (para establecer un límite de acción para la NDMA en el principio activo valsartán) y los primeros cálculos del riesgo de cáncer excesivo para el peor escenario de exposición realista, como se ha indicado anteriormente. Estos cálculos dieron como resultado un riesgo teórico de cáncer excedente durante toda la vida de 1:5000 (0.02%) por la toma diaria de 320 mg de valsartán contaminados con 24.1 μ g de NDMA (la cantidad más alta probada en el valsartán como producto terminado).

El NDEA, como el NDMA, también está clasificado por la IARC como "probablemente cancerígeno para los humanos".

Varios valores de TD_{50} para el NDEA están listados en el CPDB para ratas, monos cynomolgus y bebés galárgidos. El valor más bajo de TD_{50} calculado es de 0.00725 mg/kg/día para los tumores hepáticos en el mono cynomolgus. La TD_{50} para el NDEA obtenido en la rata es de 0.0265 mg/kg/día. En la rata, además de los tumores hepáticos, se notificaron también otros tumores, por ejemplo, de esófago, riñón y vasculatura en la rata macho.

La extrapolación al nivel de exceso de riesgo de cáncer se hace entonces de la misma manera que para el NDMA por extrapolación lineal hacia atrás a la dosis que teóricamente causa un riesgo de 1:100,000 dividiendo el TD_{50} por 50,000 (50% o $0.5 \times 100,000$). Para el NDEA esto se traduce en una dosis de 0.144 ng/kg/día extrapolada de los monos cynomolgus y 0.53 ng/kg/día extrapolada de la rata. Para una persona con un peso corporal de 50 kg esto resultaría en un nivel de ingesta aceptable de 7.2 ng/día (50×0.144 ng) o 26.5 ng/día (50×0.53 ng). 7.2 ng es igual a 0.0225 ppm y 26.5 ng es igual a 0.083 ppm en una tableta de valsartán de 320 mg. La diferencia entre los valores de TD_{50} basados en diferentes estudios/cálculos es significativa. Por lo tanto, para la evaluación del riesgo del NDEA se considera necesario evaluar primero la TD_{50} más apropiada que se utilizará como punto de partida.

Como se ha señalado anteriormente, hay al menos dos modelos diferentes para calcular el exceso de riesgo de cáncer de los animales estudiados. Ambos se basan en modelos matemáticos para ajustar primero los datos de los animales experimentales para calcular una curva de respuesta a la dosis continua y establecer puntos de referencia (por ejemplo, TD_{50} y $BMDL_{10}$) que luego se utilizan para extrapolar a un rango de dosis extremadamente bajo nunca probado y calcular los niveles de riesgo teóricos (por ejemplo, 1 en 100,000 de riesgo de cáncer adicional) para dosis bajas. La variabilidad de las dosis calculadas en esta forma puede ser significativa dependiendo de la calidad de los experimentos con animales, el número de dosis probadas en el experimento, el tamaño de los grupos de dosis en los ensayos con animales y los modelos de extrapolación.

La evaluación crítica de los datos de las especies animales (rata o mono cynomolgus) que se utilizarán para el cálculo del riesgo de exceso de NDEA pone

de relieve la fuerza y las limitaciones de los conjuntos de datos de ratas y monos. Aunque no puede excluirse que los primates no humanos sean un modelo más relevante, el enorme conjunto de datos para la rata con 14 estudios con hasta 15 dosis probadas proporcionaría un cálculo mucho más robusto y preciso de la curva dosis-respuesta. Además, los estudios con monos utilizaron una dosificación intraperitoneal, mientras que la rata fue dosificada oralmente. En el estudio más sensible en monos cynomolgus se eligió un enorme intervalo de más de 300 µg/día entre la dosis más baja y la segunda dosis. La segunda dosis ya causó cáncer en los 3 únicos animales de ese grupo. El tamaño del grupo de todos los grupos de dosis intermedias era pequeño, con sólo 3 a 7 animales por grupo. El estudio más extenso con ratas usó 9 dosis ascendentes en el mismo rango de dosis y 60 animales por grupo. Sólo se dispone de dos estudios sobre monos cynomolgus, y el segundo estudio sólo utiliza una dosis, en comparación con ocho estudios en total sobre la rata (cinco con más de un grupo de dosis).

Por lo tanto, se llegó a la conclusión de que la TD₅₀ calculada para los estudios sobre monos cynomolgus es menos fiable en comparación con la TD₅₀ calculada para los estudios sobre ratas. La TD₅₀ en rata da como resultado un nivel de ingesta aceptable de 26.5 ng/día, igual a 0.083 ppm en una tableta de valsartán de 320 mg.

De esta forma los niveles de ingesta aceptable y el exceso de riesgo teórico de cáncer calculado con TD₅₀ asociado a la ingesta de NDMA y NDEA se realizan de la siguiente manera.

Tabla 7. Exceso de riesgo teórico de cáncer calculado con TD₅₀ asociado a la ingesta de NDMA

		<i>Tumores de hígado en rata TD₅₀</i>
Dosis (mg/kg/día)		0.096
÷50,000 (ng/kg/día)		1.92
*50kg (ng/día) = Ingesta aceptable		96
*25,550 días (70 años)		2453 µg
Ingesta aceptable cuando se toma a lo largo de 6 años	÷2,190 días (6 años de exposición)	1.12 µg/día
Exceso teórico de riesgo de cáncer	Si se toma 320 mg/ día de valsartán contaminado con 24.1 µg durante 6 años	21.5 : 100,000 o aproximadamente 1:5,000 (0.02%)
÷320 mg tableta (ppm)		0.3

Tabla 8. Exceso de riesgo teórico de cáncer calculado con TD₅₀ asociado a la ingesta de NDEA

		<i>Tumores de hígado en rata TD₅₀</i>
Dosis (mg/kg/día)		0.0265
÷50,000 (ng/kg/día)		0.53
*50kg (ng/día) = Ingesta aceptable		26.5
*25,550 días (70 años)		677 µg
Ingesta aceptable cuando se toma a lo largo de 4 años	÷1,460 días (4 años de exposición)	0.46 µg/día
Exceso teórico de riesgo de cáncer	Si se toma 320 mg/ día de valsartán contaminado con 3.7 µg durante 4 años	8 : 100,000 (0.008%)
÷320 mg tableta (ppm)		0.083

Para evaluar el exceso de riesgo de cáncer acumulado en la co-exposición al NDMA y al NDEA se parte de la suposición de que los aductos de ADN se suman en la cinética lineal. Por lo tanto, el riesgo también se considera aditivo. El riesgo acumulativo se puede calcular entonces sumando los valores de riesgo de ambos compuestos calculados. Un posible escenario del peor caso sería una exposición al NDEA durante 4 años (2011 - 2015) y una exposición al NDMA durante 6 años (2012 - 2018). El exceso de riesgo teórico acumulado sería entonces de 29:100.000 o 1:3390 o 0.029%.

El uso de TD₅₀ es bien aceptado por la ICH M7 (R1) que es una norma internacional reconocida, para el cálculo del exceso de riesgo aceptable para calcular la ingesta aceptable de las impurezas mutagénicas y carcinogénicas. Sin embargo, este método puede considerarse conservador ya que las curvas de respuesta a la dosis de los estudios sobre el cáncer no suelen ser lineales, generalmente son curvas dosis-respuesta no monotónicas, lo que puede provocar una sobreestimación del riesgo real y no ser el más apropiado para los cálculos de exceso de riesgo. El uso de BMDL₁₀ podría considerarse como una estimación más realista del riesgo, sin embargo, carece de una metodología de cálculo armonizada internacionalmente, por lo tanto, no se considera adecuada para el cálculo de la ingesta aceptable.

Sin embargo, se evalúa a continuación el uso de BMDL₁₀ con datos de NDMA con fines comparativos.

El BMDL₁₀ representa una estimación de la dosis más baja, que con un 95% de certeza no causará más de un 10% de incidencia de cáncer en roedores, como punto de partida para el cálculo del exceso de riesgo de cáncer. El uso del BMDL₁₀ para el cálculo del exceso de riesgo de cáncer también se describe en la ICH M7 (R1).

Para el cálculo de los valores de BMDL₁₀ en NDMA que han sido reportados por distintos investigadores, se han utilizado los datos reportados por Peto Richard et.al. en un estudio donde se evaluó el efecto en 4,080 ratas en la ingestión crónica de NDMA y NDEA, el cual proporciona a gran detalle un estudio de dosis-respuesta (60). Dando como resultados valores de 0.029 mg/kg/día haciendo uso del software PROAST 17.9 (61), 0.062 mg/kg/día (62) y de 0.043 mg/kg/día con una versión más reciente de PROAST (RIVM 2018).

El valor de 0.062 mg/kg/día de BMDL₁₀ se basa en la incidencia de los tumores de células hepáticas como marcador y, por lo tanto, no es completamente comparable con los 0.029 y 0.043 mg/kg/día derivados de los tumores hepáticos totales. Por lo tanto, el BMDL₁₀ de 0.043 mg/kg/día se utiliza como el nivel superior más comparable del rango del BMDL₁₀.

El cálculo del exceso de riesgo teórico de 1:100,000 se hace entonces dividiendo el BMDL₁₀ por 10,000 (10% o $0.1 \times 100,000$). Utilizando 0.029 mg/kg/día como nivel inferior y 0.043 mg/kg/día como niveles superiores del rango, se obtiene un rango de 2.9 a 4.3 ng/kg/día. Para una persona de 50 kg esto sería: 145 ng/día - 215 ng/día correspondiente a 0.45 – 0.67 ppm en una tableta de valsartán de 320 mg.

De acuerdo con la regla de Haber, usando el rango de BMDL₁₀ (145 ng/día - 215 ng/día) esto resulta en una dosis aceptable de por vida asociada con un riesgo de cáncer adicional de 1:100,000 de 3705 µg -5439 µg. Dividiendo por 2190 resulta 1.7 µg/día – 2.5 µg/día como ingesta aceptable en 6 años.

Este cálculo dio como resultado un exceso teórico de riesgo de cáncer durante la vida en el rango de 9.6 - 14:100,000 (0.0096% - 0.014%) por tomar diariamente 320 mg de valsartán contaminado con 24.1 µg de NDMA (el valor medio de NDMA probado en un producto farmacéutico utilizando el principio activo fabricado por de Zhejiang Huahai Pharmaceuticals).

Este riesgo calculado es ligeramente inferior al 0.02% (1:5000) calculado con el enfoque TD₅₀, lo que demuestra que las medidas adoptadas en Unión Europea inmediatamente después de hallar el incidente fueron suficientemente protectoras y también que el enfoque TD₅₀ no es excesivamente conservador en comparación con el BMDL₁₀.

De esta forma los niveles de ingesta aceptable y el exceso de riesgo teórico de cáncer calculado con BMDL₁₀ asociado a la ingesta de NDMA y NDEA se realizan de la siguiente manera.

Tabla 9. Comparación de exceso de riesgo teórico de cáncer calculado con TD₅₀ y BMDL₁₀ asociado a la ingesta de NDMA

		<i>Tumores de hígado en rata TD₅₀</i>	<i>Tumores de hígado en rata BMDL₁₀</i>	<i>Tumores de hígado en rata BMDL₁₀</i>
Dosis (mg/kg/día)		0.096	0.029	0.043
÷50,000 (ng/kg/día)		1.92	2.9	4.3
*50kg (ng/día) = Ingesta aceptable		96	145	215
*25,550 días (70 años)		2453 µg	3705 µg	5493 µg
Ingesta aceptable cuando se toma a lo largo de 6 años	÷2,190 días (6 años de exposición)	1.12 µg/día	1.7 µg/día	2.5 µg/día
Exceso teórico de riesgo de cáncer	Si se toma 320 mg/día de valsartán contaminado con 24.1 µg durante 6 años	21.5:100,000 (0.02%)	14:100,000 (0.014%)	9.6:100,000 (0.01%)
÷320 mg tableta (ppm)		0.3	0.45	0.67

Una vez calculados los límites máximos de ingesta diaria, se debe de desarrollar y validar un método de referencia mediante ensayos cooperativos entre laboratorios y la comparación de los resultados. Este procedimiento deberá ser coordinado por la Dirección Europea para la Calidad de los Medicamentos y la Atención Sanitaria (EDQM) y los resultados finalmente publicados en la Farmacopea Europea. Posteriormente se debe de dar un periodo de transición en donde los fabricantes tendrán que demostrar que los niveles de nitrosamina en su API no son cuantificables en un ensayo sensible y validado. Deberá establecerse un límite de especificación basado en la capacidad técnica, que preferiblemente deberá derivarse del límite de cuantificación (LoQ) de un método analítico adecuadamente sensible. El concepto subyacente es que -para la exposición a largo plazo- los niveles de NDMA y NDEA deben ser lo más bajos posibles en cualquier API de sartán, sin tener en cuenta el tipo de sartán o la dosis. Por lo que se llegó a la conclusión que, una vez terminado el periodo de transición, un límite de 0.03 ppm parece alcanzable de acuerdo con los datos de la red de OMCL (Laboratorios oficiales de control de medicamentos). Por lo tanto, el período de transición también debe ser utilizado por los fabricantes para adaptar sus métodos analíticos de manera que sean lo suficientemente sensibles para medir niveles acordes con las futuras especificaciones del API para el NDMA y el NDEA.

Ranitidina

Por otro lado, se presume que la causa de la presencia de nitrosaminas en la ranitidina es debido a su estructura química, ya que la dimetilamina presente en ella y en presencia de nitritos bajo ciertas condiciones puede llevar a la formación de NDMA, el mecanismo de cómo esta reacción se lleva a cabo aún está en discusión, pero las propuestas se pueden visualizar en la **Figura 31**. En este caso, los niveles

de NDMA encontrados resultaron estar arriba de los límites aceptables establecidos, además, se confirmó que estos niveles aumentaban en la ranitidina incluso en condiciones normales de almacenamiento, y se ha comprobado que la NDMA aumenta considerablemente en las muestras almacenadas a temperaturas más elevadas, incluidas las temperaturas a las que puede estar expuesto el producto durante su distribución y manipulación por los consumidores. Las pruebas también demostraron que cuanto más antiguo es un producto de ranitidina, o cuanto más tiempo ha transcurrido desde su fabricación, mayor es el nivel de NDMA. Estas condiciones pueden elevar el nivel de NDMA en el producto de ranitidina por encima del límite de ingesta diaria aceptable (63). Por lo tanto, el retiro de este producto farmacéutico fue total en EUA, mientras que en Europa solo se exentaron a aquellos medicamentos de ranitidina que se administran por inyección o infusión como una dosis única y baja ya que se prevé que la formación de NDMA en el cuerpo será muy baja después de una sola dosis baja de ranitidina administrada por inyección o infusión (goteo) (45). La FDA también realizó algunos retiros de nizatidina, un producto farmacéutico de la misma familia que la ranitidina (antihistamínicos H₂), pero los niveles encontrados fueron menores, esto se puede deber a que el C2 en el anillo furano de la ranitidina es un sitio electrofílico fuerte debido al efecto de donación de electrones del heteroátomo de oxígeno, mientras que el C2 en el anillo tiazol de la nizatidina es un sitio nucleófilo ligero debido a los efectos combinados de los átomos de nitrógeno y de azufre.

Metformina

Con respecto a la metformina, la FDA reportó el retiro de algunos lotes, sin embargo, en este caso no se observaron cantidades preocupantes, esto se puede deber a que en su estructura el grupo DMA unido a una biguanida retira electrones, reduciendo así los rendimientos de conversión.

Rutas alternas de contaminación

Aunado a las rutas de formación explicadas anteriormente, se ha observado una nueva ruta de contaminación con NDMA y NDEA en los productos terminados relacionado con el empaque primario. Aunque los niveles observados estaban muy por debajo de los límites temporales para las *N*-nitrosaminas acordados, el informe preliminar de la investigación reveló que la formación de *N*-nitrosaminas fue causada por la reacción de la nitrocelulosa en la lámina de cubierta con los constituyentes amínicos de la tinta de impresión. Estas impurezas se transfirieron, en algunos casos, al producto del medicamento durante el proceso de sellado térmico del blíster. Una de las propuestas realizadas por el fabricante fue eliminar la causa-raíz sustituyendo las láminas de cubierta de nitrocelulosa que contienen las leyendas impresas por láminas de cubierta sin nitrocelulosa. Sin embargo, esta medida podría afectar potencialmente a muchos productos, además de tener en cuenta que los niveles observados son bajos. Se debe considerar que la nitrocelulosa que forma parte de la lámina de cierre, funge como agente nitrosante y aunque se ha señalado que la fuente de aminas es la tinta de impresión usada,

sería pertinente evaluar si los medicamentos donde en su composición existen fármacos en cuya estructura está presente una amina secundaria también pueden ser una fuente de aminas que favorezca la formación de los compuestos *N*-nitrosos.

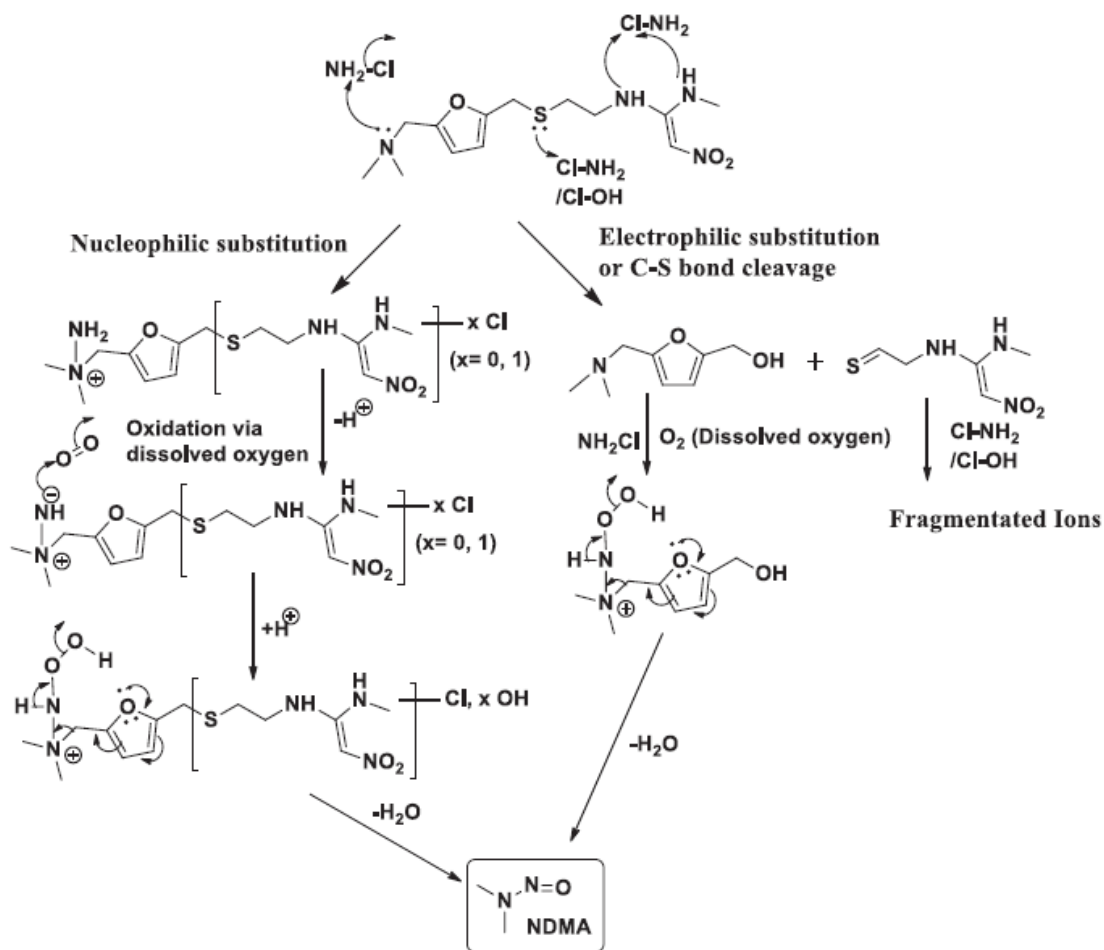


Figura 31. Mecanismos propuestos para la formación de NDMA a partir de ranitidina

Acciones de regulación nacional

En México, la Ley General de Salud, en su artículo 17 bis, especifica que la Secretaría de Salud ejercerá atribuciones de regulación, control y fomento sanitarios a través de un órgano denominado Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), cuyas funciones son identificar y evaluar riesgos para la salud humana, proponer políticas nacionales de protección contra riesgos sanitarios en establecimientos de salud, ejercer control y vigilancia sanitarios, imponer sanciones y aplicar medidas de seguridad, todo lo anterior aplicado en las materias de su competencia.

Esta institución emite tres tipos de documentos en materia de Alertas y Emergencias sanitarias y se enuncian a continuación:

Alerta sanitaria: Provoca la activación del Sistema Federal Sanitario (SFS), el cual deberá de realizar acciones de búsqueda intencionada.

Comunicado: Es de conocimiento al SFS, netamente informativo.

Aviso: Informa sobre las acciones de protección que se han ejecutado.

Este organismo emitió en julio de 2018 un comunicado a la población, informando sobre la inmovilización y no comercialización de los medicamentos cuya materia prima contuviera valsartán del fabricante Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co. Ltd, el cual es el primer fabricante que reportó presencia de impurezas en su producto (64), siendo esto la única información emitida por esta comisión con respecto a las sales de sartán. Por lo que, no es posible realizar la trazabilidad del proceso, así como la evaluación y análisis de las acciones tomadas por esta institución como se hizo con otras autoridades sanitarias como la FDA o EMA, así como tampoco es posible observar el seguimiento que se realizó después de que otros fabricantes de fármacos manifestaran el mismo problema. Para el caso de la ranitidina, esta autoridad emitió en octubre de 2019 un aviso preventivo en el que se solicitó la suspensión total del uso y comercialización de productos farmacéuticos en cuya composición contuviera el principio activo ranitidina, en tanto se tomaran las medidas que garantizaran la seguridad de los productos, señalando que la Comisión Federal se encontraría en constante comunicación con los titulares de registros para establecer las medidas que garantizaran su seguridad (65), sin embargo, no existen disponibles más actualizaciones que pudieran informar el estatus y las acciones derivadas en seguimiento al caso.

CONCLUSIONES

El continuo avance y mejora de las metodologías analíticas ha generado la detección de compuestos cuya presencia no se había observado previamente. Tal es el caso de los compuestos *N*-nitrosos, los cuales se encuentran clasificados por su carcinogenicidad en los grupos 2A y 2B según la IARC (OMS).

Los humanos nos encontramos frecuentemente en exposición a ellos ya sea por estilo de vida, exposición ocupacional, o bien, una formación *in vivo*, sin embargo, su presencia y rendimientos de formación dependerá principalmente del pH del medio y los reactivos nitrosantes.

La presencia de una amina secundaria en la estructura de un fármaco puede permitir la formación de estos compuestos, pero también será necesario considerar el resto de la estructura, ya que esta también puede influir en el éxito de conversión. Para ejercer su acción carcinogénica, los compuestos *N*-nitrosos necesitan una previa activación metabólica llevada a cabo por enzimas microsomales del CYP450.

El aseguramiento de la presencia de estos compuestos por debajo de los límites establecidos es un objetivo latente para promover el no riesgo para la población; para esto, es necesario el trabajo conjunto entre las autoridades sanitarias reguladoras de los respectivos países y el sector privado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Douglass, M. L., Kabacoff, B. L., Anderson, G. A., & Cheng, M. C. (1978). The chemistry of nitrosamine formation, inhibition and destruction. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 29(9), 581-606.
2. Rostkowska, K., Zwierz, K., Rozanski, A., Moniuszko-Jakoniuk, J., & Roszczenko, A. (1998). " Formation and Metabolism of N-Nitrosamines. *Polish Journal of Environmental Studies*, 7, 321-326.
3. Gray, J. I., & Dugan Jr, L. R. (1975). Inhibition of n-nitrosamine formation in model food systems. *Journal of Food Science*, 40(5), 981-984.
4. Mirvish, S. S., Wallcave, L., Eagen, M., & Shubik, P. (1972). Ascorbate-nitrite reaction: possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Science*, 177(4043), 65-68.
5. Sen, N. P., Smith, D. C., & Schwinghamer, L. (1969). Formation of N-nitrosamines from secondary amines and nitrite in human and animal gastric juice. *Food and cosmetics toxicology*, 7, 301-307.
6. Ramirez Victoria, P. Inhibidores de la nitrosación endógena. *Vertientes. Revista Especializada en Ciencias de la Salud*, 7(1-2).
7. Ralt, D., & Tannenbaum, S. R. (1981). The role of bacteria in nitrosamine formation.
8. Harada, K. (1980). Microbialdegradation of nitrosamines. II. Effect of the conditions of growth and enzymatic reaction on the nitrosamine breakdown. *Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fisheries*, 6, 723-726.
9. Walker, R. (1990). Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implications. *Food Additives & Contaminants*, 7(6), 717-768.
10. Thörn, M., Finnström, N., Lundgren, S., Rane, A., & Lööf, L. (2005). Cytochromes P450 and MDR1 mRNA expression along the human gastrointestinal tract. *British journal of clinical pharmacology*, 60(1), 54-60.
11. Beranek, D. T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 231(1), 11-30.
12. Swann, P. F. (1990). Why do O6-alkylguanine and O4-alkylthymine miscode? The relationship between the structure of DNA containing O6-alkylguanine and O4-alkylthymine and the mutagenic properties of these bases. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 233(1-2), 81-94.
13. Sheweita, S. A., El Banna, Y. Y., Balbaa, M., Abdullah, I. A., & Hassan, H. E. (2017). N-nitrosamines induced infertility and hepatotoxicity in male rabbits. *Environmental Toxicology*, 32(9), 2212-2220.
14. Jalili, C., Moradi, D., Roshankhah, S., & Salahshoor, M. R. (2019). Effect of pentoxifylline on kidney damage induced by nitrosamine in male rats. *Research in pharmaceutical sciences*, 14(1), 64.
15. Barnes, J. M., & Magee, P. N. (1954). Some toxic properties of dimethylnitrosamine. *British journal of industrial medicine*, 11(3), 167.
16. Magee, P. N., & Barnes, J. M. (1956). The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine. *British journal of cancer*, 10(1), 114.
17. Magee, P. N., & Barnes, J. M. (1967). Carcinogenic nitroso compounds. *In Advances in cancer research* (Vol. 10, pp. 163-246). Academic Press.

18. Druckrey, H., Ivanković, S., & Preussmann, R. (1966). Teratogenic and carcinogenic effects in the offspring after single injection of ethylnitrosourea to pregnant rats. *Nature*, 210(5043), 1378-1379.
19. Alexandrov, V. A. (1968). Blastomogenic effect of dimethylnitrosamine on pregnant rats and their offspring. *Nature*, 218(5138), 280-281.
20. Druckrey, H. (1973). Specific carcinogenic and teratogenic effects of 'indirect' alkylating methyl and ethyl compounds, and their dependency on stages of oncogenic developments. *Xenobiotica*, 3(5), 271-303.
21. Tolba, R., Kraus, T., Liedtke, C., Schwarz, M., & Weiskirchen, R. (2015). Diethylnitrosamine (DEN)-induced carcinogenic liver injury in mice. *Laboratory animals*, 49(1_suppl), 59-69.
22. Nakatani, T., Roy, G., Fujimoto, N., Asahara, T., & Ito, A. (2001). Sex hormone dependency of diethylnitrosamine-induced liver tumors in mice and chemoprevention by leuprorelin. *Japanese journal of cancer research*, 92(3), 249-256.
23. Kowsalya, R., Kaliaperumal, J., Vaishnavi, M., & Namasivayam, E. (2015). Anticancer activity of *Cynodon dactylon* L. root extract against diethyl nitrosamine induced hepatic carcinoma. *South Asian journal of cancer*, 4(2), 83.
24. Fritschi, L., Benke, G., Risch, H. A., Schulte, A., Webb, P. M., Whiteman, D. C., ... & Neale, R. E. (2015). Occupational exposure to N-nitrosamines and pesticides and risk of pancreatic cancer. *Occupational and environmental medicine*, 72(9), 678-683.
25. Majumdar, S., Thakur, D., & Chowdhury, D. (2020). DNA Carbon-Nanodots based Electrochemical Biosensor for Detection of Mutagenic Nitrosamines. *ACS Applied Bio Materials*, 3(3), 1796-1803.
26. Shen, R., & Andrews, S. A. (2011). Demonstration of 20 pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) as nitrosamine precursors during chloramine disinfection. *Water Research*, 45(2), 944-952.
27. Shen, R., & Andrews, S. A. (2013). Formation of NDMA from ranitidine and sumatriptan: The role of pH. *Water research*, 47(2), 802-810.
28. Lv, J., & Li, N. (2019). Characterization of seven psychoactive pharmaceuticals as N-nitrosodimethylamine precursors during free chlorine and chlorine dioxide chlorination processes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 94(1), 53-62.
29. Selbes, M., Beita-Sandí, W., Kim, D., & Karanfil, T. (2018). The role of chloramine species in NDMA formation. *Water research*, 140, 100-109.
30. EMA (2018), EMA reviewing medicines containing valsartan from Zhejiang Huahai following detection of an impurity: some valsartan medicines being recalled across the EU. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-reviewing-medicines-containing-valsartan-zhejiang-huahai-following-detection-impurity-some> , consultado el 06 de septiembre de 2020
31. EMA (2018), Update on review of valsartan medicines following detection of impurity in active substance: assessing potential impact on patients is priority. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/news/update-review-valsartan-medicines-following-detection-impurity-active-substance-assessing-potential> , consultado el 07 de septiembre de 2020
32. EMA (2018), Update on review of recalled valsartan medicines: preliminary assessment of possible risk to patients, Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/news/update-review-recalled-valsartan-medicines-preliminary-assessment-possible-risk-patients> , consultado el 07 de septiembre de 2020

33. EMA (2018), Update on review of valsartan medicines due to detection of NDMA: EMA reviewing valsartan produced by another company Zhejiang Tianyu, Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/news/update-review-valsartan-medicines-due-detection-ndma-ema-reviewing-valsartan-produced-another> , consultado el 07 de septiembre de 2020
34. EMA (2018), Update on medicines containing valsartan from Zhejiang Tianyu: company no longer authorised to manufacture valsartan active substance for EU medicines due to presence of NDMA, Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/news/update-medicines-containing-valsartan-zhejiang-tianyu-company-no-longer-authorised-manufacture> , consultado el 07 de septiembre de 2020
35. EMA (2018), Update on review of valsartan medicines: risk from NDMA remains low, a related substance NDEA also being investigated, Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/news/update-review-valsartan-medicines-risk-ndma-remains-low-related-substance-ndea-also-being> , consultado el 07 de septiembre de 2020
36. EMA (2018), Meeting highlights from the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) 17-20 September 2018, Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/news/meeting-highlights-committee-medicinal-products-human-use-chmp-17-20-september-2018> , consultado el 07 de septiembre de 2020
37. EMA (2018), Valsartan: review of impurities extended to other sartan medicines, Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/news/valsartan-review-impurities-extended-other-sartan-medicines> , consultado el 07 de septiembre de 2020
38. EMA (2018), EU inspection finds Zhejiang Huahai site non-compliant for manufacture of valsartan: EMA and national authorities considering impact on other active substances produced at the site, Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/news/eu-inspection-finds-zhejiang-huahai-site-non-compliant-manufacture-valsartan-ema-national> , consultado el 07 de septiembre de 2020
39. EMA (2018), EU authorities take further action in ongoing review of sartans: Zhejiang Huahai placed under increased supervision; Aurobindo Pharma stopped from supplying irbesartan to the EU, Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/news/eu-authorities-take-further-action-ongoing-review-sartans-zhejiang-huahai-placed-under-increased> , consultado el 07 de septiembre de 2020
40. EMA (2018), Valsartan from Mylan laboratories in India can no longer be used in EU medicines due to NDEA impurity, Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/news/valsartan-mylan-laboratories-india-can-no-longer-be-used-eu-medicines-due-ndea-impurity> , consultado el 07 de septiembre de 2020
41. EMA (2019), Sartan medicines: companies to review manufacturing processes to avoid presence of nitrosamine impurities, Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/news/sartan-medicines-companies-review-manufacturing-processes-avoid-presence-nitrosamine-impurities> , consultado el 07 de septiembre de 2020
42. EMA (2019). Assessment report. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/variation-report/sartans-article-31-referral-chmp-assessment-report_en.pdf , consultado el 03 de mayo de 2020

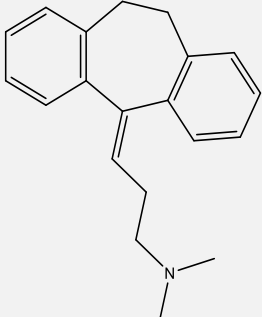
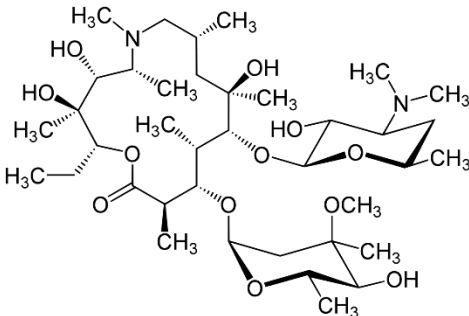
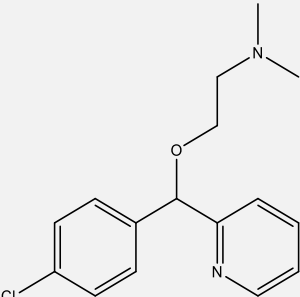
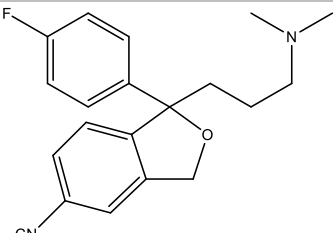
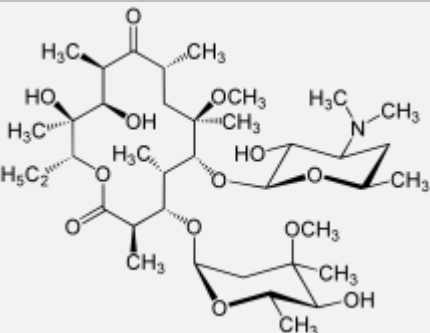
43. EMA (2019). Notification to the CHMP secretariat of a referral under article 31 of directive 2001/83/EC. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/ranitidine-article-31-referral-notification_en.pdf , consultado el 11 de noviembre de 2020
44. EMA (2020). Suspension of ranitine medicines in the EU. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/suspension-ranitidine-medicines-eu_en.pdf , consultado el 11 de noviembre de 2020
45. EMA (2020). EMA confirms recommendation to suspend all ranitine medicines in the EU. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/ranitidine-article-31-referral-ema-confirms-recommendation-suspend-all-ranitidine-medicines-eu_en.pdf, consultado el 11 de noviembre de 2020
46. EMA (2019). EMA update on metformin diabetes medicines. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/press-release/ema-update-metformin-diabetes-medicines_en.pdf , consultado el 12 de noviembre de 2020
47. Yang, C. S., Tu, Y. Y., Koop, D. R., & Coon, M. J. (1985). Metabolism of nitrosamines by purified rabbit liver cytochrome P-450 isozymes. *Cancer Research*, 45(3), 1140-1145.
48. Cremades, M., A., (1994). Tumores renales del Hámster dorado sirio condicionados por N-etil-N-nitrosourea (ENU) y dietilestilbestrol (DES): su histogenie y caracterización biológica, *ProQuest LLC*
49. Jasmin, G., & Riopelle, J. (1964). Factors influencing the production of renal tumors in rats by dimethylnitrosamine. *Revue canadienne de biologie*, 23, 129.
50. Durak, I., Akyol, Ö., Başşme, E., Canbolat, O., & Kavutcu, M. (1994). Reduced erythrocyte defense mechanisms against free radical toxicity in patients with chronic renal failure. *Nephron*, 66(1), 76-80.
51. Estrada-Carrasco, C. E., Flores-Terrazas, J. E., Floriano-Sánchez, E., Castro-Marín, M., López-Silvestre, J. L., Campos-Salcedo, J. G., ... & Cárdenas-Rodríguez, N. (2010). Regulación de enzimas antioxidantes como marcadores tumorales de la próstata. *Revista mexicana de urología*, 70(3), 157-163.
52. Morel, Y., & Barouki, R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochemical Journal*, 342(3), 481-496.
53. Cisneros Prego, E., Pupo Balboa, J., & Céspedes Miranda, E. (1997). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutación peroxidasa. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*, 16(1), 10-15.
54. Tew, K. D., Manevich, Y., Grek, C., Xiong, Y., Uys, J., & Townsend, D. M. (2011). The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(2), 299-313.
55. Sheweita, S. A., & Mostafa, M. H. (1996). N-nitrosamines and their effects on the level of glutathione, glutathione reductase and glutathione S-transferase activities in the liver of male mice. *Cancer letters*, 99(1), 29-34.
56. Mitch, W. A., Oelker, G. L., Hawley, E. L., Deeb, R. A., & Sedlak, D. L. (2005). Minimization of NDMA formation during chlorine disinfection of municipal wastewater by application of pre-formed chloramines. *Environmental Engineering Science*, 22(6), 882-890.
57. OMS, FAO (2018). Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias comité del Codex sobre contaminantes de los alimentos. Disponible en: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-735-12%252FCRDs%252Fcf12_CRD05s.pdf , consultado el 01 de diciembre de 2020

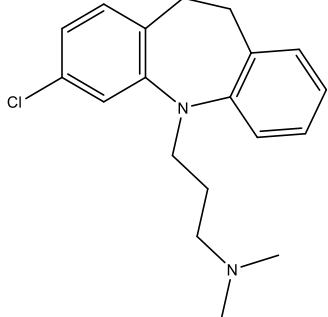
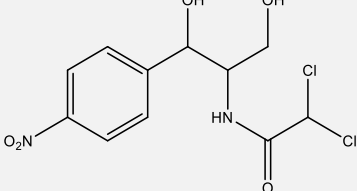
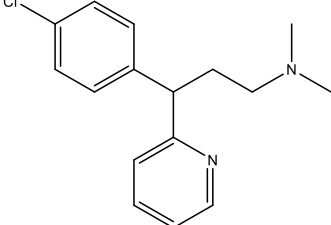
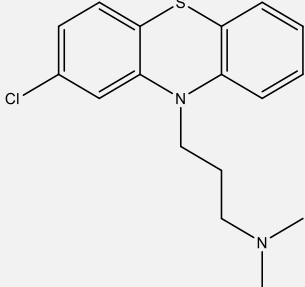
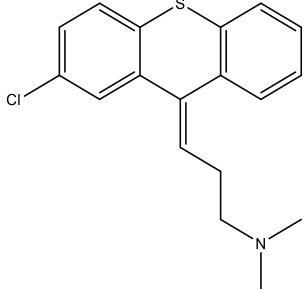
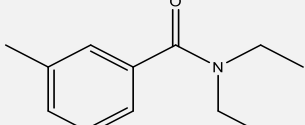
58. EMA (2015). ICH guideline M7 (R1) on assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m7r1-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit_en.pdf , consultado el 08 de diciembre de 2020
59. Barlow, Susan. Dybing, Erik, et.al. (2005). Umbral de preocupación toxicológica (TTC). *ILSI Europe*, página 17.
60. Peto, R., Gray, R., Brantom, P., & Grasso, P. (1991). Effects on 4080 rats of chronic ingestion of N-nitrosodiethylamine or N-nitrosodimethylamine: a detailed dose-response study. *Cancer research*, 51(23 Part 2), 6415-6451.
61. Zeilmaker, M. J., Bakker, M. I., Schothorst, R., & Slob, W. (2010). Risk assessment of N-nitrosodimethylamine formed endogenously after fish-with-vegetable meals. *Toxicological sciences*, 116(1), 323-335.
62. Herrmann, S. S., Duedahl-Olesen, L., Christensen, T., Olesen, P. T., & Granby, K. (2015). Dietary exposure to volatile and non-volatile N-nitrosamines from processed meat products in Denmark. *Food and Chemical Toxicology*, 80, 137-143.
63. FDA (2020). FDA Requests removal of all ranitidine products (Zantac) from the market. Disponible en: <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-requests-removal-all-ranitidine-products-zantac-market> , consultado el 08 de diciembre de 2020.
64. COFEPRIS (2018). La COFEPRIS informa sobre el retiro de productos con materia prima valsartán del fabricante Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co. Ltd. Por defecto de calidad. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/348238/Comunicado_Valsartan_20072018.pdf , consultado el 11 de diciembre de 2020.
65. COFEPRIS (2018). La COFEPRIS informa sobre los productos que contienen dentro de su formulación al principio activo denominado ranitidina. Disponible en: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/505282/Aviso_Preventivo_Ranitidina_29102019.pdf , consultado el 11 de diciembre de 2020.
66. Parr, M. K., & Joseph, J. F. (2019). NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 164, 536-549.
67. Aulbach, A. D., & Amuzie, C. J. (2017). Biomarkers in nonclinical drug development. *In A comprehensive guide to toxicology in nonclinical drug development* (pp. 447-471). Academic Press.
68. Scibior, D., & Czeczot, H. (2006). Katalaza–budowa, właściwości, funkcje [Catalase: structure, properties, and functions]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 60, 170-180.
69. Shigeki Tsuchida. (2002). Glutathione Transferases, *Encyclopedia of Cancer (Second Edition)*, Academic Press, 297-307.
70. Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical biochemistry*, 239(1), 70-76.
71. Aronson, D., Mittleman, M. A., & Burger, A. J. (2004). Elevated blood urea nitrogen level as a predictor of mortality in patients admitted for decompensated heart failure. *The American journal of medicine*, 116(7), 466-473.
72. Bostom, A. G., Kronenberg, F., & Ritz, E. (2002). Predictive performance of renal function equations for patients with chronic kidney disease and normal serum creatinine levels. *Journal of the American Society of Nephrology*, 13(8), 2140-2144.
73. Mitch, W. A., & Sedlak, D. L. (2002). Formation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) from dimethylamine during chlorination. *Environmental Science & Technology*, 36(4), 588-595.

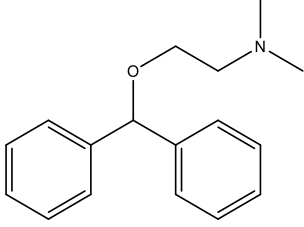
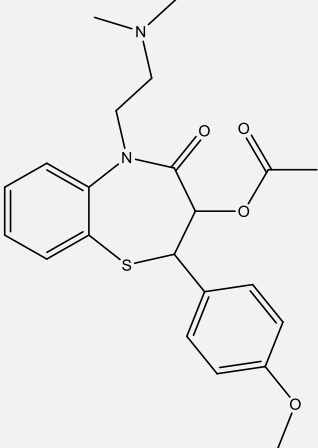
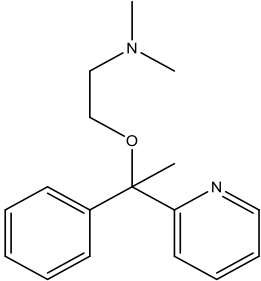
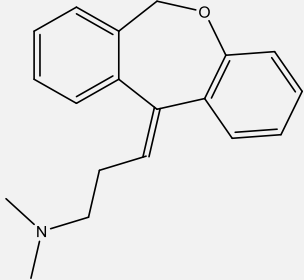
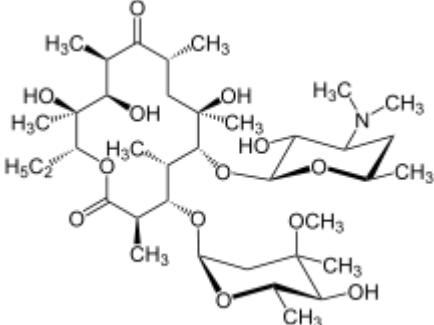
74. Seiler, J. P. (1977). Nitrosation in vitro and in vivo by sodium nitrite, and mutagenicity of nitrogenous pesticides. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 48(2), 225-236.
75. Williams, D. L. H. (2004). *Nitrosation reactions and the chemistry of nitric oxide*. Elsevier.
76. Williams, D. L. H. (1983). Nitrosation mechanisms. *Advances in Physical Organic Chemistry*, 19, 381-428.
77. Rasmussen, J. K., & Hassner, A. (1974). Synthetic methods. VI. Addition of nitrosyl chloride to trimethylsilyl enol ethers. New general method for nitrosation of carbonyl compounds. *The Journal of Organic Chemistry*, 39(17), 2558-2561.
78. Crookes, M. J., & Williams, D. L. H. (1988). Nitrosation by alkyl nitrites. Part 2. Kinetics of reactions in aqueous acid solution with isopropyl and t-butyl nitrites. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (7), 1339-1343.
79. Molander, G. A., & Cavalcanti, L. N. (2012). Nitrosation of aryl and heteroaryltrifluoroborates with nitrosonium tetrafluoroborate. *The Journal of organic chemistry*, 77(9), 4402-4413.
80. Smith, P. A., & Loeppky, R. N. (1967). Nitrosative cleavage of tertiary amines. *Journal of the American Chemical Society*, 89(5), 1147-1157.
81. Williams, D. L. H. (1977). S-nitrosation of thiourea and thiocyanate ion. Nitrosyl thiocyanate and the S-nitroso-adduct of thiourea as nitrosating agents. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (1), 128-132.
82. Burwell, L. S., Nadtochiy, S. M., Tompkins, A. J., Young, S., & Brookes, P. S. (2006). Direct evidence for S-nitrosation of mitochondrial complex I. *Biochemical Journal*, 394(3), 627-634.

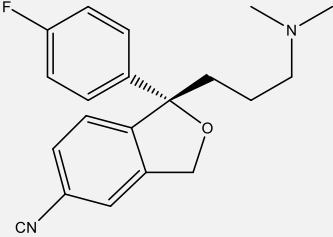
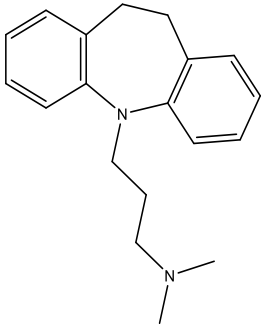
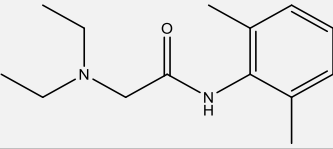
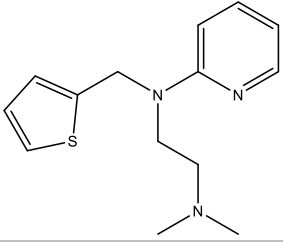
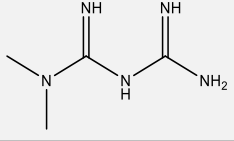
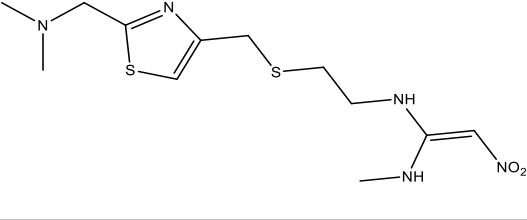
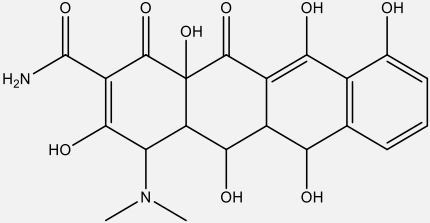
APÉNDICE

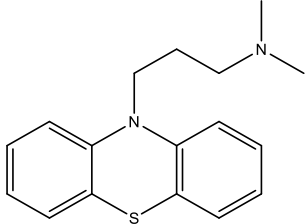
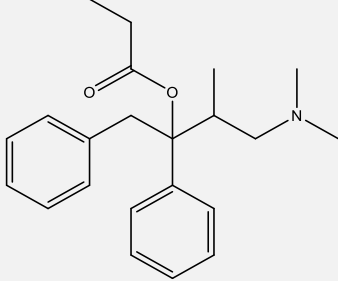
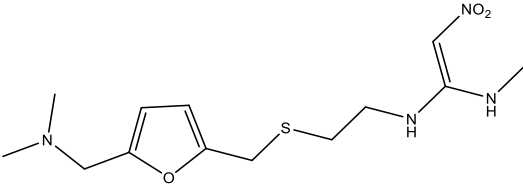
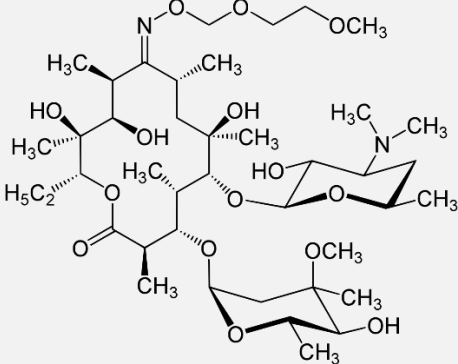
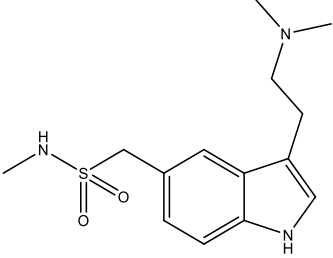
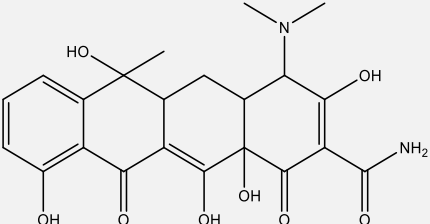
Tabla 10. Estructuras de los Ingredientes Activos Farmacéuticos que han mostrado ser capaces de producir nitrosaminas con distintos rendimientos

Nombre	Estructura	Uso
Amitriptilina ^{27, 28, 66}		Antidepresivo
Azitromicina ²⁷		Antibiótico
Carbonixamina ²⁷		Antihistamínico
Citalopram ²⁸		Antidepresivo
Claritromicina ²⁷		Antibiótico

Clomipramina²⁸		Antidepresivo
Cloranfenicol⁶⁶		Antibiótico
Clorfenamina²⁷		Antihistamínico
Clorpromazina^{28, 66}		Antipsicótico
Clorprotixeno²⁸		Antipsicótico
DEET²⁷		Repelente de insectos

Difenhidramina ^{27, 66}		Antihistamínico
Diltiazem ²⁷		Antihipertensivo
Doxilamina ⁶⁶		Antihistamínico
Doxepina ²⁸		Antidepressivo
Eritromicina ^{27, 66}		Antibiótico

Escitalopram ^{27, 66}		Antidepressivo
Imipramina ⁶⁶		Antidepressivo
Lidocaína ²⁷		Anestésico
Metapirileno ⁶⁶		Antihistamínico
Metformina ²⁷		Antidiabético
Nizatidina ²⁷		Antihistamínico
Oxitetraciclina ⁶⁶		Antibiótico

Promazina⁶⁶		Antipsicótico
Propoxifeno⁶⁶		Analgésico
Ranitidina²⁷		Antihistamínico
Roxitromicina²⁷		Antibiótico
Sumatriptán²⁷		Tratamiento agudo de la migraña
Tetraciclina^{27, 66}		Antibiótico

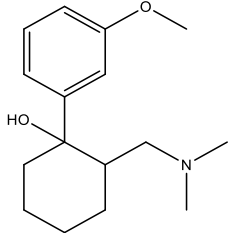
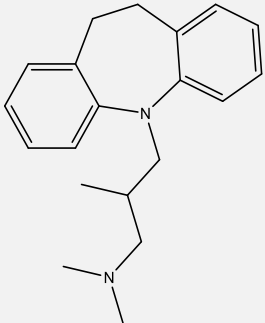
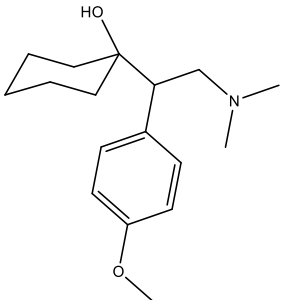
Tramadol²⁷		Analgésico
Trimipramina⁶⁶		Antidepressivo
Venlafaxina^{27, 28}		Antidepressivo

Tabla 11. Estructuras de las principales impurezas de *N*-nitrosaminas con sus respectivos precursores y su fuente probable

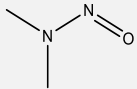
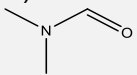
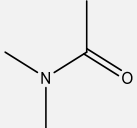

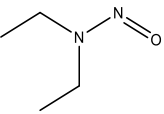
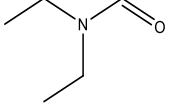
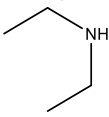
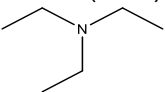
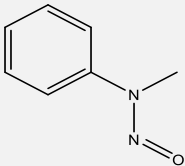
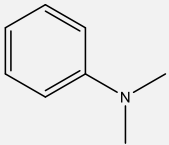
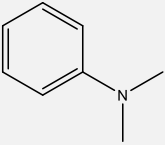
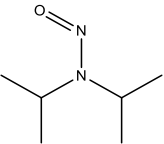
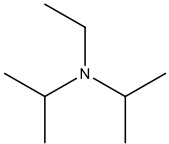
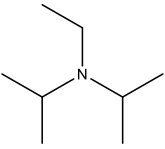
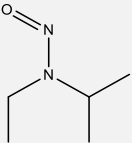
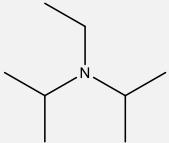
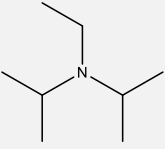
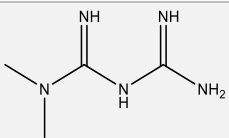
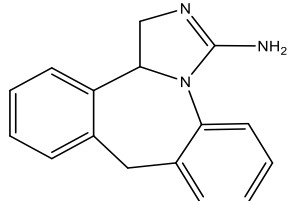
Nitrosamina	Fuente de NO_x	Fuente de amina	Amina nitrosada por NO_x
<i>N</i>-dimetilnitrosamina (NDMA) 	NaNO ₂	Dimetilformamida (DMF)-Disolvente  Dimetilacetamida (DMA)-Disolvente 	Dimetilamina (DMA) 
<i>N</i>-dietilnitrosamina (NDEA) 	NaNO ₂	Trietanolamina (TEA)- Reactivo o disolvente 	Dietilamina (DEA)  Trietilamina (TEA) 
<i>N</i>-<i>n</i>-metilfenilnitrosamina (NMPA) 	NaNO ₂	Dimetilfenilamina (<i>N,N</i> -DMA)- Reactivo 	Dimetilfenilamina (<i>N,N</i> -DMA) 
<i>N</i>-disopropilnitrosamina (DIPNA) 	NaNO ₂	DIPEA-Reactivo o disolvente (Base de Hünig) 	DIPEA 
<i>N</i>-etilisopropilnitrosamina (EIPNA) 	NaNO ₂	DIPEA-Reactivo o disolvente (Base de Hünig) 	DIPEA 

Tabla 12. Estructuras que podrían ser capaces de producir nitrosaminas de acuerdo a su estructura

Nombre	Estructura	Uso
Afatinib		Anticancerígeno
Epinastina		Antihistamínico