



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*FORMULACIÓN, OBTENCIÓN Y
CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS DE
LIBERACIÓN MODIFICADA DE
IVERMECTINA. ESTUDIOS IN VIVO*

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
GORETTI VÁSQUEZ SANJUÁN



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: EFREN HERNÁNDEZ BALTAZAR

VOCAL: Profesor: ENRIQUE AMADOR GONZÁLEZ

SECRETARIO: Profesor: MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

1er. SUPLENTE: Profesor: IVÁN ALEJANDRO FRANCO MORALES

2° SUPLENTE: Profesor: ABRAHAM FAUSTINO VEGA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 002 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA EDIFICIO F, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM, CIUDAD UNIVERSITARIA.

ASESOR DEL TEMA: MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

SUPERVISOR TÉCNICO: LORENA GARCÍA GONZÁLEZ

SUSTENTANTE: GORETTI VÁSQUEZ SANJUÁN

Agradecimientos

Por el apoyo, cariño, tiempo y conocimiento brindado, a la Dra. Ma. Josefa Bernad Bernad

A la Dra. Lilia Gutierrez Olvera por su ayuda, conocimientos y aportaciones en los estudios de campo para la realización de este trabajo.

A la M.C. Nuria Esturao Escofet por sus contribuciones e interpretaciones en RMN.

Al Dr. Luis Medina por su apoyo técnico, aportaciones e interpretaciones en reología de geles.

A la Dra. Marina Gavilanes Ruiz por brindarme material de apoyo.

A la Q. Laurel E. Fabila Ibarra por el apoyo técnico brindado, la capacitación y su disposición en el préstamo de equipo.

Al I.Q Iván Puente Lee por su apoyo en Microscopia Electrónica.

A la M.C Lorena García Gonzalez y al c.Dr Abraham Faustino Vega por su conocimiento y aportaciones en este trabajo

“Ser Mexicano es un orgullo , ser de la UNAM es un honor ”

Dedicatorias

Tengo una gran deuda de gratitud con todos ustedes que me han brindado voluntariamente su tiempo y cariño y es por ustedes que estoy aquí.

A mi familia

A mis padres que me han dado tanto amor y comprensión, que me han dado lo mejor de ellos y que siempre confiaron en mí, gracias papito, gracias mamita . Los amo.

A mis hermanos:

Edith, gracias hermanita por ser parte de mi vida y hacerme la vida tan feliz, te agradezco todo lo que me has brindado y por el ejemplo que siempre has sido.

Iván gracias flaquito por todas las risas, cariño, amor y los abrazos que me has proporcionado, por tu apoyo moral y económico.

Paquito, hermanito eres uno de mis motivos de vivir, y aunque eres más pequeño que yo me has enseñado tanto, de ti he aprendido que para salir adelante es cuestión de querer vivir. Te quiero enano.

A Eduardo por el apoyo, cariño y respeto, por ser parte de mi familia.

A mis padrinos (Onesimo y Lore) por el amor que me han brindado y por el apoyo y valores que me enseñaron.

Pame, lo hemos logrado, tanto esfuerzo funciona, gracias por estar siempre conmigo, alentarme, por confiar y creer en mí, gracias por acompañar mi camino en todo momento, te quiero mucho .

A Silvia por cuidar de Pame y de mí por siempre ofrecerme palabras de aliento, y motivarnos a seguir adelante.

A mis amigos

Marianita gracias por todo tu apoyo, por tu hombro y tus abrazos, gracias por ser mi angel, y confiar en mi, eres mi hermanita de vida, te quiero mucho.

Roberto siempre estaré en deuda contigo no solo por tu apoyo y ayuda en la carrera sino por todo el cariño y la amistad brindada.

Ammmed, que te puedo decir, si tu sabes lo mucho que te quiero, este es un paso muy importante en mi vida y tu formas parte de ella, gracias a por cariño, tu tiempo, compañía y sobre todo tu amistad.

Sarita gracias pequeñita por tu amistad, y por todos los gratos momentos que hemos vivido. La carrera no hubiera sido tan sensacional sin ti.

Mercy, amiguis mia, gracias por tu amistad, y por quererme y defenderme.

Veris, amiga muchas gracias por todo tu cariño, eres muy importante para mi no lo olvides.

Zaine , gracias por tu amistad y cariño, no siempre llegamos primero, pero si sabemos llegar.

Oscar, Richi, David gracias por todo el cariño y amistad que me han dado, son grandes amigos, los aprecio y admiro mucho.

Sergio, muchas gracias por todo el cariño que me brindaste, cambiaste mi vida, y siempre atesorare tu amistad.

Melvin, gracias por levantarme siempre el ego, y mostrarme tu cariño, eres genial chocolatito.

Ernesto agradezco infinitamente tu apoyo y conocimiento brindado, pero en especial tu amistad, tu tiempo y cariño.

Bea, Ania, Jose, Itzia, Adrian, Jorge, Caín, Dennis, Pau, Kari e Iván por su compañía, apoyo, ayuda y amistad brindada y por compartir conmigo grandes momentos.

Índice

I.- Resumen.....	1
II.- Introducción.....	2
III.-Antecedentes.....	4
3.0 Parasitosis.....	4
3.1.-Garrapatas.....	5
3.1.1 Garrapata <i>Boophilus microplus</i>	6
3.1.1.1 Ciclo de Vida.....	8
3.1.1.2. Patología.....	8
3.1.1.3 Control de garrapatas.....	9
3.1.1.3.1 Control no químico.....	9
3.1.1.4 Ivermectina.....	12
3.1.1.4.1 Farmacodinamia.....	13
3.1.1.4.2 Farmacocinética para animales domésticos.....	14
3.1.1.5 Closantel.....	16
3.1.1.5.1 Farmacodinamia.....	17
3.1.1.5.2 Farmacocinética.....	17
3.1.1.6 Tratamientos novedosos contra garrapatas.....	18
3.2 Sistemas de liberación controlada.....	19
3.2.1 Sistemas de liberación controlada de fármacos vía parenteral.....	22
3.2.2 Geles.....	22
3.2.2.1 Propiedades físicas de los geles.....	23
3.2.2.2 Tipos de fluidos.....	25
3.2.2.3 Geles de formación <i>in situ</i>	26
3.2.3. Nanopartículas.....	28
3.2.3.1 Métodos de elaboración.....	28
3.2.3.1.1 Polimerización interfacial.....	28
3.2.3.1.2 "Salting-out".....	29
3.2.3.1.3 Desplazamiento del disolvente.....	29
3.2.3.1.4 Emulsión evaporación.....	29
3.2.3.1.5 Microemulsión por fusión.....	29
3.2.3.1.6 Emulsión – difusión.....	30
3.2.3.2 Caracterización de Nanopartículas.....	36

3.2.3.2.1 Tamaño de Partícula.....	36
3.2.3.2.2 Potencial Zeta (ζ).....	36
3.2.3.2.3 Morfología.....	36
3.2.3.2.4. Comportamiento térmico.....	37
3.2.2.2.5 Espectroscopia IR.....	37
3.2.3.2.6 Espectroscopia RMN (Resonancia Magnética Nuclear).....	37
V.- Metodología.....	39
5.1.- Materiales.....	39
5.2. Elaboración de diagramas de fase.....	39
5.3. Determinación del punto de inversión por la técnica de tamaño de glóbulo.....	40
5.4.- Fabricación de nanopartículas.....	40
5.4.1. Nanopartículas de PLGA.....	40
5.4.2. Nanopartículas de PLA.....	41
5.4.3.- Caracterización de nanopartículas.....	41
5.4.4 Concentración de Nanopartículas.....	42
5.5. Elaboración del Gel.....	43
5.5.1 Caracterización del gel.....	43
VI.- Resultados y discusión.....	44
6.1. Diagramas de fase.....	44
6.2. Tamaño de glóbulo.....	45
6.3. Caracterización de las nanopartículas.....	48
6.3.1. Tamaño de partícula y potencial zeta.....	48
6.3.2. DSC.....	50
6.3.3 IR.....	51
6.3.4 Cromatografía en capa fina.....	53
6.3.6. Resonancia magnética nuclear.....	54
6.4 Reología del Gel.....	58
6.5 Estudios in vivo.....	61
VII.- Conclusiones.....	66
VIII.-Referencias.....	67

I.- Resumen

Ante la problemática que presenta el sector ganadero debido a parásitos como *Boophilus microplus*, y las resistencias cada vez más frecuentes hacia los fármacos que comúnmente se emplean para combatir este tipo de plagas, así como los efectos negativos que producen los métodos convencionales; En este trabajo se plantea el desarrollo y caracterización de sistemas de liberación modificada de Ivermectina e Ivermectina-closantel, empleando polímeros biodegradables para la elaboración de nanopartículas, y poliacrilatos para la elaboración de geles de formación *in situ*.

Para la elaboración de nanopartículas se emplea la técnica de emulsión-difusión, usando como polímero PLGA (ácido poliláctico glicólico), tween 80 como estabilizante y acetato de etilo como fase orgánica en la formación de la emulsión, debido a su baja toxicidad y permitiendo, así, su administración parenteral.

Con respecto al gel de formación *in situ* se emplea una mezcla hidroalcohólica y poliacrilatos, a este sistema además de contener ivermectina se le adicionó closantel para brindar un espectro más amplio.

El sistema nanoparticulado fue caracterizado al medir tamaño de partícula, potencial zeta, DSC, FTIR, SEM y ¹H-RMN. Se logró mantener sus características al ser concentrado por centrifugación. Obteniéndose una suspensión de nanocápsulas poco estables físicamente debido al potencial zeta, pero con tamaño y reproducibilidad viables para su administración,

La reología del gel indica que la viscosidad del sistema se ve afectada por la velocidad de corte más que por la temperatura, y que su comportamiento es viscoelástico.

Los sistemas obtenidos se administraron en bovinos para evaluar su efectividad clínica obteniéndose efectividades del 100% para el gel y 80- 60% para las Np de PLGA.

II.- Introducción

El problema de parásitos y las enfermedades transmitidas por éstos cobran cada día más importancia e interés en la práctica de la Clínica Veterinaria e Industria ganadera de México y el Mundo.

Sus medidas de control dependen de la región, de la situación socioeconómica y del avance tecnológico.

Uno de los parásito que ha provocado pérdidas millonarias en la industria ganadera es *Boophilus microplus*.

El impacto negativo de *Boophilus microplus* a la ganadería vierte en varios factores como son el daño a las pieles por acción de las picaduras, pérdida de sangre, efectos tóxicos, un mayor tiempo de engorda y también en la producción de leche. Por otro lado, son transportadores de agentes como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*. Agentes que provocan enfermedades que están asociadas con fiebre y anemia hemolítica progresivas, siendo menos severas en animales jóvenes que en adultos

La estrategia más utilizada para el control de estos parásitos consiste en la aplicación de ixodicidas sobre el cuerpo del animal; sin embargo, el periodo de protección que ofrecen contra la reinfestación es corto por lo que el tratamiento debe de ser frecuente, provocando un gran estrés en los animales y por ende pérdidas significativas de peso.

Es por ello la importancia de desarrollar nuevos preparados farmacéuticos del principio activo, que tengan una liberación modificada para prolongar su tiempo de acción y/o poder conducir al fármaco al sitio de acción.

El uso de acarreadores poliméricos como nanopartículas puede ofrecer una liberación modificada, ejemplos de estos polímeros sintéticos biodegradables son al ácido poliláctico, (PLA), ácido poliláctico- coglicólico, PLGA, poli (ϵ -caprolactona) PCL, entre otros. Con ellos se puede encapsular al fármaco proporcionándole protección y estabilidad.

Es en este tipo de sistemas se pueden introducir a la ivermectina, antiparasitario de interés en veterinaria, dado que es una de las sustancias que se utiliza en el tratamiento de diversas afecciones por *Boophilus microplus*.

Por otra parte, la formación de geles in-situ usando poli etilenglicol (PEG) y ácido polimetacrílico (PMA) o ácido poliacrílico (PAA) como sistema inyectable

de liberación de fármacos es una alternativa viable para contener ivermectina y closantel generando un efecto sobre garrapatas y helmintos.

III.-Antecedentes

3.0 Parasitosis

Las infecciones causadas por helmintos son considerablemente importantes en animales domésticos. Los ciclos de vida directos y acceso por pastoreo a los estados infectivos de los parásitos, ayudados por prácticas de agricultura intensivas hacen de los herbívoros un blanco fácil para muchas especies de nematodos[1].

Las infecciones en el ganado bovino causadas por parásitos provocan graves pérdidas económicas en todas las regiones del mundo. La industria ganadera aun depende en gran medida del uso de antihelmínticos para combatir nematodos gastrointestinales y trematodos hepáticos, que son los más importantes. Para el control de estas infecciones, una gama de nematicidas y flukicidas están disponibles, pero el número de combinaciones para tratar tanto la infección por nematodos y trematodos es limitada.

La combinación de ivermectina y closantel proporciona una actividad más amplia, mientras la ivermectina proporciona una alta eficacia contra nematodos, el closantel la tiene contra trematodos del hígado y nematodos succionadores de sangre [2].

El espectro de estos principios activos incluye:

Parásitos internos:

Tremátodos: *Fasciola hepática*, *Fasciola gigantica* (formas adultas e inmaduras mayores a 4 semanas)

Nemátodos gastrointestinales: *Haemonchus spp*, *Ostertagia lyrata*, *Ostertagia circumcincta*, *Cooperia oncophora*, entre otros.

Gusanos pulmonares: *Dyctiocalus viviparus* y *Dyctiocalus filaria*.

Parásitos externos

Piojos chupadores: *Linognathus vituli*, *Bovivola spp*, *Microthoracius prolongiceps*.

Piojos masticadores: ayuda en el control de *Damalinea Bovis* y *Damalinea aucheniae*.

Ácaros productores de sarna: *Psoroptes Boris*, *Sarcoptes scabie*, entre otros.

Garrapatas: *Boophilus microplus*, *Amblyomma parvitarsum*, etc[3].

3.1.-Garrapatas

Las garrapatas son uno de los ectoparásitos más importantes actualmente, ocasionan daños directos sobre animales domésticos y silvestres, por otro lado transmiten peligrosos patógenos al hombre. Estos efectos inician desde el momento de sustraer la sangre, ya que pueden llegar a transmitir virus, bacterias, protozoarios o toxinas. Las garrapatas pertenecen al grupo *subphylum Chelicerata*, clase *Arachnida*, orden *Acarina* y pueden ser familia *Argasidae* o *Ixodidae*. Esta última se caracteriza porque presentan escudo pequeño en las hembras y grande en el macho.

Los estadios evolutivos de este tipo de parásitos son: huevo, larva, ninfa y adulto y el desarrollo puede ocurrir en uno, dos o tres huéspedes. El estadio evolutivo comprende tres fases principalmente:

Fase no parasítica

La fase no parasítica comprende desde que la garrapata hembra con los huevos se desprende de su hospedero hasta la aparición de las larvas en la vegetación. Esta fase se divide en cinco períodos (Tabla 1):

Tabla 1. Etapas de la fase no parasítica[4]

Período	Preoviposición	Oviposición	Post-oviposición	Incubación	Eclosión
Características	Comprende desde el desprendimiento de la hembra con los huevos hasta que deposita el primer huevo.	Inicia con la puesta de los primeros huevos hasta los últimos	Abarca desde que la garrapata pone el último huevo hasta que muere.	Se inicia con la oviposición y termina en la emergencia de las larvas	La larva emerge del huevo.

Fase de encuentro

La fase de encuentro se define como el proceso de transferencia de las larvas desde la vegetación al hospedero y está influenciada por variables básicas como la distribución, longevidad, ritmos de actividad de las larvas, la estructura y tipo de vegetación, así como la densidad de bovinos y aspectos relacionados

con su comportamiento en el pastizal; esta fase comprende dos períodos: pasivo y búsqueda:

Periodo pasivo

Comprende desde el primer estímulo posterior a la eclosión de las larvas, requiriéndose de un periodo para que dichas larvas adquieran viabilidad necesaria para resistir los efectos del ambiente.

Periodo de búsqueda

Es el tiempo que transcurre entre el periodo pasivo y el encuentro del hospedero, este periodo es uno de los más críticos en la vida de las garrapatas ya que necesitan encontrar un hospedero adecuado, nutrirse y completar su ciclo.

La duración de la fase de encuentro varía de acuerdo a las condiciones climáticas, influyendo principalmente la temperatura y la humedad ambiental. A medida que aumenta la temperatura la sobrevivencia larval disminuye. Por lo que respecta a la longevidad, ésta se ve beneficiada en los meses húmedos

Fase parasítica

Esta fase completa el ciclo biológico de la garrapata, este período comprende una serie de eventos patológicos sobre el hospedero que conlleva a las pérdidas directas e indirectas ocasionadas por la presencia de estados de ninfas y adultos. La presencia de otros parásitos restringe la incorporación de nuevos individuos, así como algunos factores físicos del hospedero, como son tipo de pelo, densidad de glándulas sudoríparas y sebáceas, etc [4].

3.1.1 Garrapata *Boophilus microplus*

Cerca del 10% de las 800 especies conocidas de garrapatas están establecidas en México. En nuestro país se han identificado 77 especies de garrapatas pertenecientes a 5 géneros de la familia *Argasidae* y 7 a la familia *Ixodidae*. El número de especies de garrapatas existentes en México representa el 45% de América Latina [5, 6]. Debido a las variables climáticas que muestra nuestro país hay zonas idóneas para el desarrollo de la garrapata.

Se estima que las pérdidas producidas por las garrapatas y las enfermedades que transmiten son de aproximadamente 48 millones de dólares anualmente. Uno de los parásitos que más ha producido daños a la ganadería de nuestro país es *Boophilus microplus*, ésta es un garrapata originaria de la India y que fue introducida a muchas áreas tropicales y subtropicales del mundo incluyendo Australia, Africa, América Central y Sur [7]. En contraste con la mayoría de las garrapatas ixodes, *B. microplus* completa sus estadios de larva, ninfa y adulto en un solo hospedero. La larva que se alimenta muda a ninfa y posteriormente a adulta. Las garrapatas adultas requieren alimentarse de sangre y aparearse antes de caer del hospedero, y depositar los huevos en el pasto e iniciar la fase parasítica y de encuentro (Fig. 1).

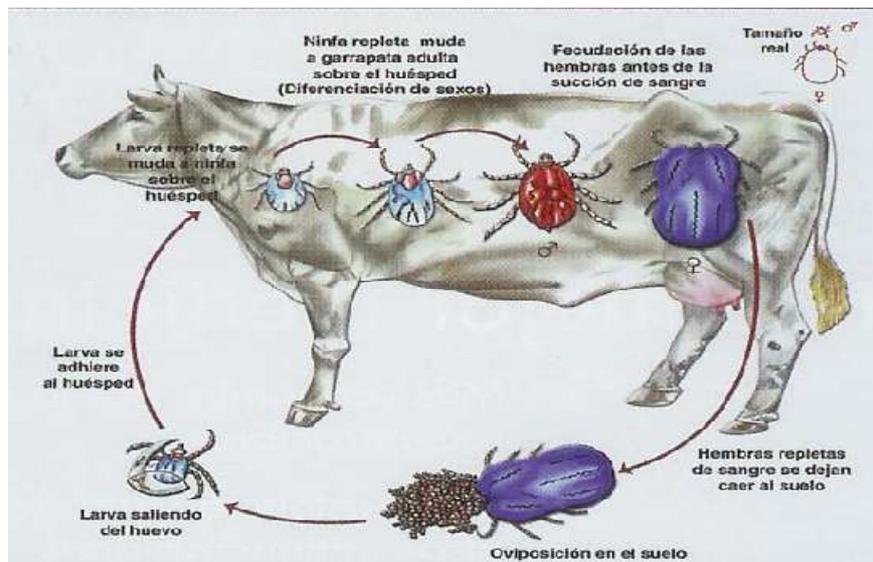


Figura 1. Ciclo biológico de *Boophilus microplus*[4]

Los machos adultos permanecen en el animal por semanas o meses, a diferencia de las adultas que mueren poco después de ovipositar.

3.1.1.1 Ciclo de Vida

El ciclo de vida se resume en el siguiente esquema:

Tabla 2. Cronología evolutiva de *B. microplus* [4]

Periodo	Duración (días)
Preoviposición	2-39
Oviposición	4-44
Incubación huevos	14-146
Alimentación de la larva y muda	7-10
Alimentación de la ninfa y muda	5-12
Alimentación hembra adulta	5-12
Supervivencia larva en ayuno	240 o más

3.1.1.2. Patología

La babesiosis bovina es causada por parásitos protozoarios del género. El vector de *Babesia* es la garrapata, donde *Boophilus microplus* es el vector principal de *B. bigemina* y *B. bovis*, y se encuentra ampliamente distribuido en los trópicos y subtrópicos. Las infecciones se caracterizan por fiebre alta, ataxia, anorexia, shock circulatorio y a veces también síntomas nerviosos como resultado del secuestro de eritrocitos infectados en los capilares cerebrales. Los animales infectados desarrollan una inmunidad de por vida frente a la reinfección con las mismas especies.

También existe evidencia de un grado de protección cruzada en animales inmunes a *B. bigemina* frente a posteriores infecciones por *B. bovis*. Los terneros raramente muestran signos clínicos de enfermedad después de la infección, independientemente de la especie de *Babesia* implicada o el estado inmune de las madres[8].

3.1.1.3 Control de garrapatas

Para poder iniciar un programa de control de garrapatas es necesario conocer varios aspectos de la región, como los ecológicos, tecnológicos, sociales y económicos. Existen dos formas de combatir al parásito, una es en el campo y la otra es sobre el animal.

3.1.1.3.1 Control no químico

En cuanto a controles no químicos se cuenta con la resistencia del hospedero, el control biológico, la modificación del hábitat de la garrapata y las vacunas.

Resistencia del hospedero

La raza *Bos taurus* es más susceptible a las infestaciones por garrapatas que la raza *Bos indicus*. La resistencia por parte del hospedero se manifiesta con una reducida repleción de la hembra, disminución en la oviposición, baja o nula viabilidad de los huevos, entre otros factores.

Control biológico

Algunos insectos como las hormigas de la especie *Pheidole megacephala*, el acaro *Anystis baccarum* y algunas aves en México tienen efecto depredador sobre la población de garrapatas.

Modificación del hábitat

La composición de la vegetación en la zona tiene un efecto directo sobre la vida de la garrapata adulta, huevos y larvas.

Praderas con alta vegetación y arbustos proporcionan el hábitat perfecto para estos parásitos, mientras zonas con plantas como leguminosa tropical y gramíneas forrajeras atrapan, repelen y obstaculizan a la garrapata, es por ello el uso estratégico de éstas.

Vacunas

La vacuna "tickGard" utilizada en Australia contiene antígenos (Bm86) situados en la superficie de las células del intestino de la garrapata *B. microplus*, al administrarse esta vacuna, el animal genera anticuerpos, cuando la garrapata ingiere la sangre del hospedero, los anticuerpos específicos producen la lisis de las células de su intestino. En México la vacuna Gavac® contiene el antígeno recombinante de rBm86, la cual ha tenido una efectividad del 51 al 91%[4].

3.1.1.3.2 Control químico

El método más eficiente para el control de garrapatas es la utilización de sustancias químicas. El empleo de este método se puede aplicar considerando la formulación del producto.

Actualmente existen 6 grupos de productos que se emplean en México para el control de estos parásitos y se pueden clasificar como Organofosforados, Piretroides, Amidinas, Endectocidas, Fenilpirazolonas e Inhibidores del desarrollo.

En la tabla 3 se resumen las características de cada una de las sustancias antes mencionadas:

Tabla 3. Principales sustancias para el control de garrapatas [4]

Producto Químico	Mecanismo de acción
Organofosforados	Se caracterizan por inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa produciendo un aumento de estímulos nerviosos de los insectos. Ejemplos: Clorfenvinfos, Clorpirifos.
Piretroides,	Provocan un bloqueo de la actividad motriz o bien por la producción de excitabilidad, incoordinación de movimientos, irritabilidad, parálisis, letargo y muerte del insecto. Como ejemplos se pueden mencionar la Cipermetrina y la Deltametrina.
Endectocidas,	Son lactonas macrocíclicas que incrementan la liberación del GABA del SN del insecto. Se presentan en dos grupos importantes a) Avermectinas que incluyen avermectina, ivermectina y doramectina, b) Milbemicinas que incluye a la moxidectina[9]
Fenilpirazolonas	Bloquean el paso de iones cloro a través del sistema receptor GABA. Ejemplo el Fipronil.
Amidinas	Inhiben las monoaminoxidasas. El producto de mayor uso es el Amitraz.
Inhibidores del desarrollo	El fluazuron interfiere en la formación de la quitina.

Actualmente los organofosforados, piretroides, amidas y lactonas macrocíclicas son los principales acaricidas utilizadas en México y los Estados Unidos para controlar garrapatas. Dentro de estas principales lactonas macrocíclicas empleadas se encuentra la ivermectina que es altamente eficaz contra las garrapatas que se encuentran en el hospedero, proporcionando una eficacia de >99.9 %, y una disminución en el número de garrapatas, índice de fecundidad y masa de los huevos[10].

3.1.1.4 Ivermectina

La ivermectina es un Endectocida perteneciente al grupo de las avermectinas, que fue sintetizado a partir de un fermentado de *Streptomyces avermitilis*, del cual se obtiene un anillo lactona macrocíclico que muestra efectos como antibiótico, antinematódico y una marcada toxicidad contra los artrópodos.

Esta avermectina ha mostrado un efecto satisfactorio tanto anti-garrapaticida como ovarioestático (reduciendo la oviposición de las hembras) [11, 12].

Tabla 4. Características Fisicoquímicas de la ivermectina [13-15].

<p>Estructura química</p>	<p>Component B_{1a} R = CH₂CH₃ Component B_{1b} R = CH₃</p> <p>La ivermectina contiene 80% de 22-23 dihidroavermectin B1a y 20% de 22-23 dihidro-avermectin B1b.</p>
<p>Nombre químico</p>	<p>5-O- dimetil-22-23-dihidroavermectina A1a</p>
<p>Fórmula condensada</p> <p>22-23dihidroavermectinaB1a</p> <p>22-23dihidro-avermectin B1b</p>	<p>C₄₈H₇₄O₁₄</p> <p>C₄₇H₇₂O₁₄</p>
<p>Peso molecular</p> <p>22-23 dihidroavermectina B1a</p> <p>22-23 dihidro-avermectin B1b</p>	<p>875.1 g/mol</p> <p>861.1 g/mol</p>

Aspecto físico	Cristales incoloros
Solubilidad en agua	4 mg/L
Solubilidad (disolventes orgánicos)	Acetato de etilo, aceite de ricino, metanol, acetonitrilo, propilenglicol, etc.
Punto fusión	157-159°C
Toxicidad	LD50 29.5 mg/kg (ratón, vía oral). LD50 10 mg/kg (rata, vía oral). Los efectos adversos son dolor muscular o abdominal, vértigo, fiebre, dolor de cabeza, sarpullido y ritmo cardiaco acelerado.
Unión a proteínas	93%
t ½ de eliminación	16- 28 horas en animales de pastoreo
Almacenamiento	Conservar en lugares secos, protegidos de la luz y calor. Temperatura de conservación 0-30°C.

3.1.1.4.1 Farmacodinamia

El mecanismo de acción de la ivermectina involucra la potenciación de los efectos del ácido γ -amino butírico (GABA) tipo A, neurotransmisor encargado de inhibir las respuestas motoras en los parásitos con lo que provoca su inmovilización o parálisis y finalmente la muerte, por otra parte se ve involucrada la interacción con canales glutamato-cloruro independientes de GABA, incrementando la permeabilidad de la membrana celular de las neuronas de parásito a los iones cloruro. Estos canales se asocian a la subunidad α del receptor de glutamato (GluCIR) que se encuentra en el músculo de la faringe y en la musculatura somática [16]. De esta manera la Ivermectina causa bloqueo neuromuscular, resultando en parálisis flácida y la eventual muerte del parásito.

Ambos receptores, mediante los cuales actúa la Ivermectina pertenecen a la súper familia de los receptores de tipo canal iónico.

En los humanos, GABA y glutamato no afectan las funciones motoras periféricas, por lo cual la Ivermectina paraliza selectivamente a invertebrados. La Ivermectina es tolerada por mamíferos, ya que los receptores de glutamato y GABA dependientes de canales de cloro están localizados sólo en el sistema nervioso central (SNC), y el fármaco no puede cruzar la barrera hematoencefálica (BHE). Su gran tamaño molecular y el alto grado de unión a las proteínas del plasma limitan su paso hacia el SNC a través de la BHE. Esta limitada distribución hacia el SNC parece ser el factor más importante en la seguridad para el huésped mamífero vertebrado.

3.1.1.4.2 Farmacocinética para animales domésticos

Los laboratorios que comercializan ivermectina han desarrollado varias formulaciones que permiten la aplicación por diferentes vías (subcutáneo, oral y tópica). La fórmula para vía oral muestra menor biodisponibilidad; por vía intrarruminal se estima que el fármaco alcanza 40% de biodisponibilidad, pero sus valores en plasma pueden durar de 7-14 días, lo cual permite suponer que a dosis bajas de 10-40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ puede ser muy eficaz para el control de las infestaciones por parásitos sensibles al medicamento. No se recomienda la vía intramuscular. Los procesos de absorción manifiestan diferencias según las vías de aplicación y las especies tratadas; por ejemplo: en el perro, después de administrar el fármaco por vía oral, se alcanza la $C_{p_{\max}}$ en 4-6 h. En bovinos, las ivermectinas se detectan en plasma después de 1h de haberlas aplicado y hasta 30 días después de la administración de una dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por vía subcutánea (SC). Algunos preparados oleosos aplicados por vía SC, llegan a brindar concentraciones terapéuticas por 80-90 días. Presenta una vida media de 36 h. Si se administra por vía IV, la vida media se reduce a 30 h. Por vía IV, la $T_{1/2\beta}$ en ovinos es de 40 h y en bovinos de 43 h; sin embargo, es de conocer que en el ovino, cuando se administra por vía intrarruminal, la vida media del fármaco es hasta de 178 h. Los bolos de liberación prolongada proveen dosis eficaces inmediatamente después de administrados; a partir de ahí la dosis terapéutica (12 $\text{mg}/\text{día}$), se libera durante 135 días aproximadamente. El volumen de distribución es muy alto: > 5.3 l/kg, con ligeras variantes en las diferentes especies. Se distribuyen ampliamente en los tejidos y por lo general se encuentran residuos en bilis, grasa, hígado y menos en el cerebro

La biotransformación de la Ivermectina se lleva a cabo por procesos de hidroxilación dentro y fuera del sistema microsomal, incluso ruminal o intestinal. El porcentaje de recuperación de metabolitos en plasma puede ser de un 91.5%.

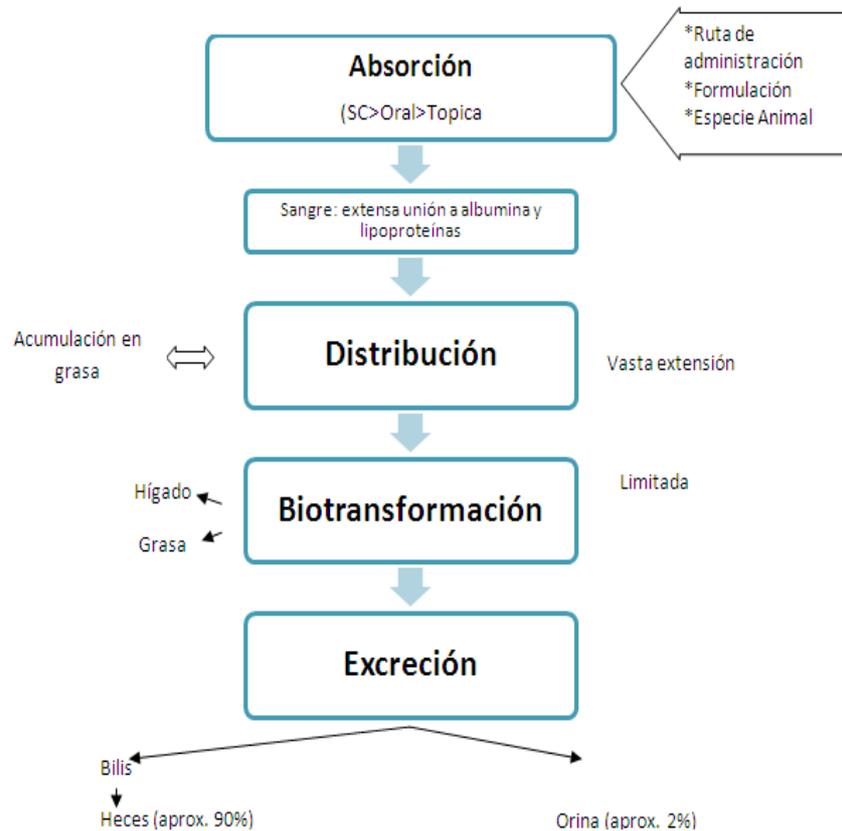


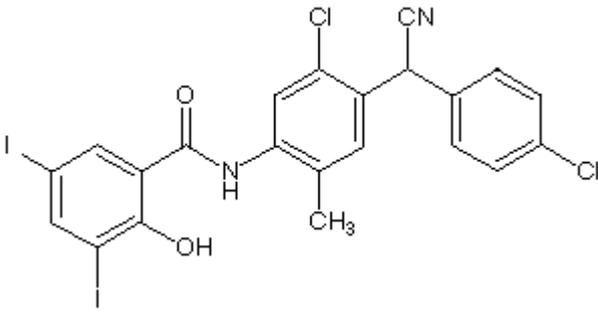
Figura 2. Farmacocinética de la ivermectina [17]

En cuanto a antihelmínticos de gran importancia contra huevos y especies maduras de *Fasciola hepatica*, se encuentra el closantel.

3.1.1.5 Closantel

Es un antiparasitario salicilanilida descubierto por la farmacéutica Janssen en 1977. Este compuesto tiene propiedades antihelmínticas y actividad ectoparasítica, presentando las siguientes características fisicoquímicas.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas del closantel [18].

Estructura química	 <p>The chemical structure of Closantel is shown. It consists of a central benzamide core. The benzamide ring has a hydroxyl group (-OH) at the 2-position and an iodine atom (-I) at the 3-position. The amide nitrogen is attached to a 4-chlorophenyl ring. This ring is further substituted with a methyl group (-CH₃) at the 2-position and a cyanomethyl group (-CH₂CN) at the 4-position. The cyanomethyl group is attached to a 4-chlorophenyl ring.</p>
Nombre químico	<i>N</i> -[5-Cloro-4-[(<i>RS</i>)-(4-clorofenil) cianometil-2-metilfenil]-2-hidroxi-3,5-didobenzamida
Fórmula condensada	C ₂₂ H ₁₄ Cl ₂ I ₂ N ₂ O ₂
Peso molecular	663 g/mol
Aspecto físico	Polvo amarillo, ligeramente higroscópico
Solubilidad en agua	Muy poco soluble
Solubilidad (disolventes orgánicos)	Soluble en metanol y etanol
Punto fusión	215-235 °C

3.1.1.5.1 Farmacodinamia

Los cambios a nivel ultraestructural son los primeros en manifestarse, siendo los disturbios en la mitocondria los más evidentes. Después de 2 h de haberse administrado, el parásito queda paralizado y después de 8 h se alteran los procesos de absorción. En las siguientes 12-24 h, se manifiestan los daños más marcados, donde se involucran los órganos sexuales del parásito. Como otras salicilanilidas, el closantel ha demostrado ser un potente desacoplador de electrones en la fosforilación oxidativa de las mitocondrias con lo que se evita que el parásito disponga de energía, causando la muerte del mismo.

3.1.1.5.2 Farmacocinética

Después de administrar closantel en bovinos y ovinos, se une fuertemente a la albúmina sérica y por ello, su prolongada estancia en el plasma le permite mantener una vida media muy larga, lo que se traduce en efectos contra parásitos que ingieren sangre normalmente, como *Haemonchus contortus* y *Fasciola hepática*.

Una vez introducido al organismo entra a torrente sanguíneo y se une altamente a proteínas plasmáticas. Los picos séricos se alcanzan entre 24 y 48 horas, con una vida media plasmática de 15 ± 3.7 días. Aproximadamente el 90% del closantel se excreta sin cambios en las heces y la orina de los bóvidos.

Por vía oral alcanza su $C_{p_{max}}$ en 40 h, en cambio, cuando se aplica por vía parenteral se logra en 1-2 días. Su vida media puede ser hasta de 2-3 sem., la biodisponibilidad cuando se administra por vía oral es hasta del 50%. Se metaboliza por reducción menos del 2% y se elimina por las heces y por la orina.

La mayor concentración de closantel se encuentra en riñón y debido a que su metabolismo es muy lento, el tiempo de retiro no debe ser menor de 40 días; por ejemplo en Ovinos se detectan residuos hasta 42 días post-tratamiento y en bovino hasta 56 días después. No se recomienda administrarlo en vacas lecheras [3, 18-20].

3.1.1.6 Tratamientos novedosos contra garrapatas

El desarrollo de sistemas de liberación modificada ha cobrado una gran importancia en la industria veterinaria para la administración de antihelmínticos, antiparasitarios, insecticidas, ixodicidas y antimicrobianos. Buscando prevenir los efectos adversos en el animal.

Dado los beneficios que trae consigo la liberación modificada, actualmente existen gran cantidad de formas farmacéuticas, las cuales se mencionan a continuación:

- Implantes subcutáneos a base de polímeros biodegradables o implantes que liberan el fármaco en patrones pulsátiles de orden cero.
- Microesferas y microcapsulas para inyección directa de un fármaco en el sitio de acción.
- Formulaciones “spot on” (pequeño volumen) en base oleosa que son añadidas directamente a la piel y pueden liberar el fármaco durante un mes.
- -Matrices a base de silicona que contienen ivermectina en el núcleo.
- Aretes y collares fabricados a base de plástico o PVC los cuales contienen el pesticida impregnado (Amidinas, Piretroides, organofosforados, etc) y su eliminación es paulatina y sostenida, a partir del sitio de aplicación alcanzan todo el cuerpo del animal.
- Dispositivos orales donde se encuentran, los bolos intrarrumiales como Spanbolet®.
- Otros dispositivos orales actualmente usados son los sistemas terapéuticos rúmiales, éstos están basados en la liberación del fármaco por medio de una diferencia significativa de presión osmótica, de tal manera que por dicha variación de presiones se ve modificada la velocidad de liberación del fármaco; este sistema provee la liberación del fármaco por poco más de un año en el rumen de las vacas y borregos. Algunos productos que están en el mercado son, Paractect Flex® Bolus, Rumensin ABC®, Spanbolet®II y Penacur SR® [4, 21-26].
- Formulaciones inyectables de liberación controlada a base de aceites (aceite de ajonjolí, oleato de etilo) o con glicerol y/o propilenglicol con una pequeña parte de agua. Su administración puede ser de tipo subcutáneo, intramuscular o intravenoso.

Dentro de estas presentaciones comerciales se encuentran las siguientes que por la duración en el organismo del animal fueron seleccionados:

	Laboratorio	Presentación	Duración
Baymec® prolong	Bayer	Solución inyectable 1g/100 mL	42 días
Dectiver® Premium	La Pisa	Solución inyectable 31.5 mg/ 100 mL	100 días
Ivomec® Gold	Merial	Solución inyectable ivermectina 31.5 %	75 días

De esta forma, la elaboración de sistemas de liberación modificada como un gel de formación in situ o la elaboración de nanopartículas de polímeros biodegradables con ivermectina nos proporciona la ventaja de liberar el principio activo de forma prolongada y en el caso de las nanopartículas (Np) evitar la respuesta inmune.

3.2 Sistemas de liberación controlada

Generalidades

Los sistemas de liberación controlada (SLC) son de los grandes avances del presente siglo, los cuales han surgido como alternativa a las formas de dosificación convencionales (tabletas, jarabes, cápsulas, etc.).

Los SLC son sistemas capaces de liberar al fármaco de manera controlada en el tiempo y/o de manera dirigida a un sitio específico del organismo, logrando mantener niveles plasmáticos semejantes a los logrados con una infusión intravenosa continua y durante un periodo de tiempo más largo.

Algunos SLC son capaces de liberar al fármaco sólo cuando éste es necesario, lo cual logra reducir los efectos adversos causados al paciente [27].

Muchas formulaciones basadas en éstos pueden incrementar la eficiencia de los fármacos lábiles, así como permitir que el fármaco pase a través de las barreras fisiológicas para llegar al sitio de acción, resistiendo al metabolismo y ataque químico. Los fármacos lábiles, tales como los péptidos, proteínas y enzimas,

que pueden perder su actividad por efecto del medio en el que se encuentran, se ven protegidos, incrementando su actividad y al mismo tiempo minimizando los efectos secundarios que pudiesen causar después de su administración [14].

Por otro lado, las desventajas van ligadas a los efectos de toxicidad provocados por el mal funcionamiento de los SLC, dentro de estas desventajas se pueden mencionar principalmente tres:

- La pronta liberación de toda la carga del activo, cantidades consideradas para periodos largos y por ende, tóxicas si son liberadas de forma inmediata.
- La imposibilidad de retirar el sistema en caso de efectos adversos, aunque no todos cumplen con tal comportamiento.
- El costo para manufactura de un SLC, el cual es en general mayor que el de una forma farmacéutica convencional [27].

En base a la sofisticación técnica del sistema de liberación controlada de fármacos se han clasificado de la siguiente manera:

1.-Sistemas de liberación de fármacos de velocidad preprogramada.

En estos sistemas la entrega de moléculas de fármaco se realiza por sistemas de liberación preprogramados a un tipo de perfil específico. Esto se logra mediante el diseño, el cual controla la difusión molecular del fármaco. Utilizando frecuentemente las leyes de difusión de Fick.

En éstos sistemas se encuentran las siguientes clasificaciones:

- Sistemas de liberación controlada de fármacos por permeación de la membrana polimérica
- Sistemas de liberación controlada de fármacos por difusión de matriz polimérica.
- Sistemas tipo híbridos (membrana/matriz) polimerica.
- Partición de microreservorios

2.-Sistemas de liberación de fármacos con activación modulada.

En éste grupo la liberación del fármaco es activada por procesos físicos, químicos o bioquímicos y/o facilitada por una energía externa. Y éstos son clasificados en base a la naturaleza del proceso aplicado o al tipo de energía aplicada, encontrando las siguientes categorías:

Medios Físicos

Sistemas de liberación de fármacos activados por:

- Presión osmótica
- Presión hidrodinámica
- Presión de vapor
- Fuerzas mecánicas
- Magnetismo
- Sonoforesis
- Iontoforesis
- Hidratación

Medios Químicos

Sistemas activados por:

- pH
- Iones
- Hidrólisis

Medios bioquímicos

Sistemas activados enzimáticamente

3.- Sistemas de liberación de fármacos regulados por retroalimentación.

La liberación de las moléculas de fármaco es activada y regulada por un agente bioquímico detectado por un sensor colocado dentro del SLC[28].

3.2.1 Sistemas de liberación controlada de fármacos vía parenteral

Las formas de dosificación parenteral con acción controlada son de gran importancia médica y económica. Medicamente son de interés ya que al mantener concentraciones terapéuticas por un largo periodo de tiempo reduce el número de inyecciones al paciente, y económicamente al disminuir la frecuencia y número de inyecciones, el costo de la terapia es menor.

Existen tres principales maneras de abordar la prolongación de la administración parenteral:

Métodos farmacológicos

Incluyen la administración intramuscular o subcutánea en vez de intravenosa; la administración simultánea de vasoconstrictores (adrenalina en anestésicos locales, efedrina en soluciones de heparina, etc.).

Métodos químicos

Estos métodos emplean el uso de sales, ésteres, y complejos del principio activo con baja solubilidad.

Métodos físicos

Incluyen la selección de vehículos oleosos en vez de soluciones acuosas, la adición de macromoléculas que incrementan la viscosidad (carboximetilcelulosa, tragacanto, etc.); la adición de adsorbentes, uso de suspensiones acuosas y oleosas, además de implantes, etc.

Las suspensiones, las micro y nano partículas, liposomas, geles, y emulsiones representan formas importantes de liberación de fármacos, por vía oral y parenteral [29].

3.2.2 Geles

La USP define a los geles como un sistema semisólido constituido de suspensiones a base de pequeñas partículas inorgánicas o grandes partículas orgánicas interpenetradas por un líquido. Cuando la masa del gel consiste en una red de partículas pequeñas, el gel es clasificado como un sistema de dos fases o también llamado bifásico.

Geles de una sola fase consisten en macromoléculas orgánicas uniformemente distribuidas a través de un líquido.

Los geles de una sola fase se describen como redes tridimensionales por adición de proteínas, polisacáridos y macromoléculas en un líquido apropiado.

En aplicaciones farmacéuticas, agua y mezclas hidroalcohólicas son las más comunes.

Los geles farmacéuticos muchas veces son categorizados en base a su microestructura, en base a lo anterior Flory sugiere la siguiente clasificación:

1.- Redes de polímeros unidos covalentemente con estructuras completamente desordenadas.

Preparados típicamente con polímeros hidrofílicos, por ejemplo poliacrilamida (PAAm) y alcohol polivinílico (PVA).

2.-Redes de polímeros unidos físicamente, desordenado predominantemente pero conteniendo un lugar ordenado.

Estos geles son formados por polímeros orgánicos como proteínas y polisacáridos (gelatina y alginatos) y derivados de celulosa semisintéticos, sin embargo polímeros sintéticos y hidrofílicos también se incluyen.

3.-Estructuras laminares ordenadas, incluyendo mesofases formadas por arcillas inorgánicas.

Para la elaboración de estos geles se emplea bentonita, silicato de magnesio aluminio, hectorita y laponita[30].

3.2.2.1 Propiedades físicas de los geles

Las propiedades físicas de los geles son clasificadas en dos grupos: Propiedades transicionales (incluyendo el punto de gelación, retrogradación y sinéresis) y propiedades reológicas (incluyendo rigidez y resistencia a la ruptura).

Propiedades transicionales

Punto de gel.- El punto de gel caracteriza a la transición del estado líquido al sólido, químicamente se define como el punto donde aparecen las primeras redes de polímeros.

Retrogradación.- Es la reversión espontanea de una solución de polímero en gel.

Sinéresis.- Es el proceso donde el líquido es liberado espontáneamente de la matriz del gel [30].

Propiedades reológicas

La velocidad de corte " $\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt}$ ", es la medida de deformación de un líquido (flujo) mientras la viscosidad " η " es la resistencia al flujo. Claramente un gel tiene propiedades (líquidas y sólidas) porque es un semisólido, siendo por lo tanto sustancias viscoelásticas. Los sólidos ideales se deforman cuando se les aplican tensiones, pero recuperan completamente su forma original al cesar la tensión, esta característica se denomina elasticidad[30].

Los geles de polímeros son fuertes y elásticos. Cuando se someten a tensiones de deslizamiento superiores a sus límites elásticos aparentes, tienden a romperse o a desmenuzarse más que a fluir. Solamente los geles que son débiles por encontrarse cerca de su temperatura de gelificación o por tener bajo contenido de sólidos, se licúan a soles y fluyen bajo el efecto de altas tensiones de deslizamiento.

Clark y Ross-Murphy (1987), propusieron una subdivisión de los geles físicos en "geles fuertes" o "verdaderos" y "geles débiles", de acuerdo a las propiedades de flujo que estos manifiesten y al comportamiento macroscópico de los mismos, de esta manera:

1. Geles fuertes o verdaderos; aquellos que forman una estructura macroscópica, estable mecánicamente y capaces de autosostenerse y por lo tanto, no muestran flujo estacionario en la escala de tiempo de medición, y
2. Geles débiles; redes tridimensionales de carácter transitorio, en donde la componente elástica es menos evidente y fluyen más fácilmente cuando los esfuerzos aplicados son lo suficientemente grandes.

3.2.2.2 Tipos de fluidos

La siguiente clasificación se basa en la variación de la viscosidad en función de la velocidad de deformación.

Fluido newtoniano. Es aquel cuya viscosidad permanece constante independientemente de la magnitud de la velocidad de deformación. La curva de flujo es una línea recta con ordenada al origen igual a cero y pendiente igual a la viscosidad del fluido.

Fluido no newtoniano. Es el fluido cuya viscosidad depende de la velocidad de corte.

Fluido pseudoplástico. En este tipo de fluidos la viscosidad disminuye al aumentar la velocidad de deformación.

Fluido dilatante. Son aquellos cuya viscosidad se incrementa con el aumento de la velocidad de deformación.

Fluido tixotrópico. Aquellos fluidos que manifiestan una disminución continua de su viscosidad con el tiempo durante la aplicación de una fuerza de corte y la recuperación posterior de esta propiedad después de un tiempo en reposo.

La siguiente imagen (Fig. 3), muestra el comportamiento reológico de los principales tipos de fluidos donde la pendiente corresponde a la viscosidad [30].

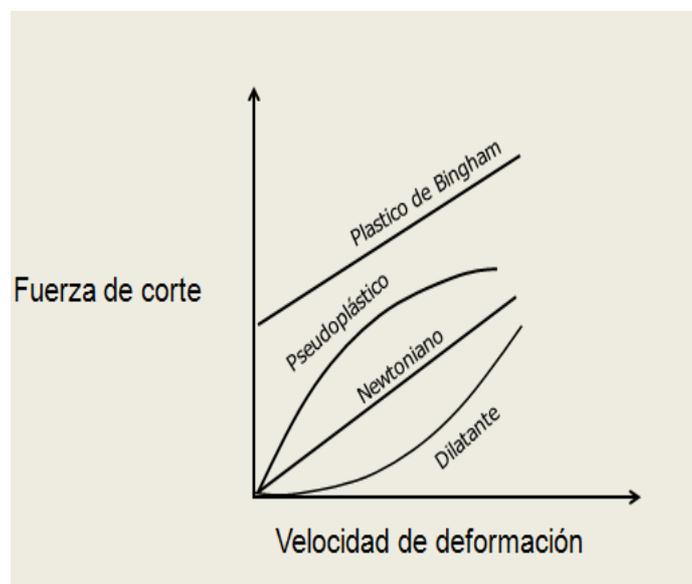


Figura 3. Comportamiento reológico de los principales tipos de fluidos.

3.2.2.3 Geles de formación *in situ*

Las formulaciones poliméricas de formación *in situ* son sistemas de liberación de fármacos que se comportan como un líquido antes de ser administrado en el cuerpo, y una vez administrado al cuerpo, experimentan una gelación *in situ*, formando un gel [31, 32].

Varios polímeros son usados para la elaboración de geles de formación *in situ*, incluyendo alginatos, xiloglucanos, pectinas, quitosan, ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico glicólico (PLGA), polimetil acrilato (PMMA), ácido polimetacrílico (PMA) y polietilenglicol (PEG). La selección del disolvente como agua, etanol, dimetilsulfóxido, N- metil pirrolidona, etc; depende de la solubilidad del polímero [33].

La gelación puede verse afectada por alteraciones en el pH, en la fuerza iónica, solvente o temperatura.

El hidrogel formado por sulfuro de oxido de polietileno (PEOS) depende altamente de la temperatura para que el entrecruzamiento se lleve a cabo. Por lo que al inyectar este gel subcutáneamente, se coloca una almohadilla caliente, para que la gelación se lleve a cabo [34].

Otra alternativa la proporciona la mezcla de hidrazida-carboximetilcelulosa con aldehído- dextran, el gel se forma *in situ* debido a la presencia de puentes de hidrazona. Este gel con Anfotericina (AmB) proporciona una actividad anti fúngica, con un tiempo de liberación *in vitro* de 11 días [35].

En este trabajo se propone la formación de geles *in situ* usando polietilenglicol (PEG), ácido polimetacrílico (PMA) y ácido poliacrílico (PAA) como sistema inyectable de liberación de fármacos. Esto se debe a que la formación se lleva a cabo por difusión del disolvente [32].

A pHs bajos, la solubilidad acuosa del complejo entrecruzado es mínima, pero una solución viscosa clara se obtiene cuando se añade etanol. Cuando esta solución que contiene un fármaco se inyecta en el entorno fisiológico, la gelificación se inicia por una membrana formada alrededor del líquido inyectado causada por difusión del etanol y la infusión de fluidos. Conforme el tiempo avanza el complejo se disocia, liberando los fármacos contenidos en él. Estos polímeros son excretados renalmente debido a su bajo peso molecular [32]. El entrecruzamiento entre las cadenas de polímeros lineales como PAA/PMA y

PEG puede deberse a la mutua atracción entre las unidades repetitivas [36, 37].

La adición de alcohol causa la expansión de los dominios debido a la repulsión electrostática entre los grupos carboxilos cargados, que finalmente llevan a la disociación del complejo [38].

En la Figura 4 se observa un esquema de la formación del gel *in situ*.

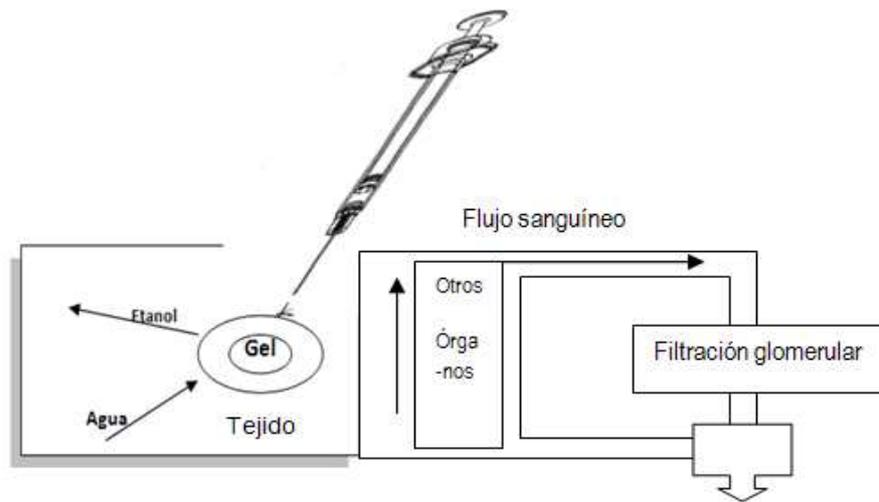


Figura 4. Formación del Gel, el etanol difunde hacia afuera y es reemplazado por el agua. Los polímeros disueltos son eliminados por excreción renal[32].

3.2.3. Nanopartículas

Generalidades

Las Nanopartículas (NP) son pequeñas partículas coloidales hechas de polímeros biodegradables y/o no biodegradables o a base de lípidos. Algunos de estos polímeros son: el ácido poliláctico (PLA), ácido poliglicólico (PGA), y su copolímero, el ácido poliláctico-glicólico (PLGA), los poliácridatos y policaprolactonas. En el caso de polímeros biodegradables como PLA y PGA se hidrolizan en el cuerpo, formando metabolitos como el ácido láctico y el ácido glicólico, los cuales son eventualmente eliminados por el ciclo del ácido cítrico. La toxicidad de estos polímeros ha sido evaluada en animales, y los resultados han sido diversos, pero algunos han resultado ser muy poco dañinos, tal es así que muchos de estos polímeros han sido utilizados como materiales para la elaboración de órganos artificiales [39, 40].

El tamaño de las nanopartículas oscilan entre 10 y 999 nm. Dentro de los principales grupos de nanopartículas se tienen a las Nanoesferas (NE) y a las Nanocápsulas (NC). En las primeras se tiene un sistema matricial en donde el fármaco se encuentra distribuido uniformemente. Mientras que en las NC son sistemas reservorios compuestos de una membrana polimérica que recubre un centro oleoso (Fig. 5) [41].

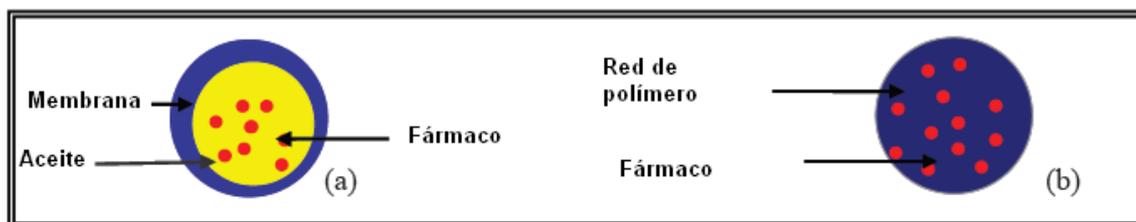


Figura 5. (a) Microcápsulas. (b) Microesferas [42]

3.2.3.1 Métodos de elaboración

3.2.3.1.1 Polimerización interfacial

Como su nombre lo describe involucra una reacción de polimerización que ocurre en la interfase entre los nanoglobulos de aceite que contiene el fármaco y una fase acuosa[43, 44].

3.2.3.1.2 “Salting-out”

Este método se basa en la separación de un disolvente miscible con agua de una disolución acuosa mediante efecto de *salting-out*. La emulsión obtenida mediante el salting-out es aceite en agua (o/w). La fase oleosa de la emulsión está compuesta por el polímero, el activo y el disolvente, y la fase acuosa contiene un electrolito y un estabilizante coloidal. Posteriormente, se agrega agua hasta tener un volumen suficiente en el cual se permita la difusión del disolvente a la fase acuosa y se formen las nanopartículas[14].

3.2.3.1.3 Desplazamiento del disolvente

En dicho proceso, el polímero se disuelve en un disolvente orgánico que se evapora fácilmente y que sea miscible en agua. Una solución de fármaco en el mismo disolvente se adiciona a la solución del polímero, y una vez obtenida la mezcla se agrega agua conteniendo un estabilizante. La suspensión obtenida debe ser concentrada, evaporando el disolvente orgánico, y el agua residual debe eliminarse bajo presión reducida[14].

3.2.3.1.4 Emulsión evaporación

El polímero y el fármaco se disuelven en un disolvente orgánico que sea inmisible en agua (Ej. Cloroformo o diclorometano), esta fase se emulsifica con agitación en una fase acuosa que contiene tensoactivos necesarios para estabilizar la emulsión formada. Esta emulsión se somete a la acción de un homogenizador o ultrasonido con el objetivo de reducir el tamaño de la gota. El disolvente es eliminado con calor y vacío, la remoción del disolvente genera la formación de nanoesferas.

3.2.3.1.5 Microemulsión por fusión

Se entiende por microemulsión un sistema de dos fases, compuesto por una fase interna y una fase externa donde el tamaño es menor a 1µm. Éstas se obtienen por agitación constante a 60–70° C hasta obtener una mezcla ópticamente transparente, que normalmente está compuesta por un ácido graso de punto de fusión bajo, un tensoactivo, un cotensoactivo y agua. La microemulsión caliente se dispersa en agua fría (2-3° C) bajo agitación. El volumen de agua fría que debe agregarse a la microemulsión caliente debe ser de 25 a 50 veces mayor. Es importante considerar que esta técnica es

recomendada para obtener nanopartículas sólidas lipídicas, ya que el punto de fusión de los ácidos grasos es menor que el de los polímeros sintéticos, pero en algunos casos resulta ser una buena opción aplicarla para polímeros con bajo punto de fusión y que tengan la capacidad de disolver al fármaco en cuestión [14, 45].

3.2.3.1.6 Emulsión – difusión

Una emulsión se caracteriza por ser un sistema disperso aceite en agua o agua en aceite. En el siguiente esquema (Fig. 6) se puede observar que en la emulsión agua en aceite las partes hidrofílicas de las moléculas están orientadas hacia la fase acuosa mientras que las hidrófobas se encuentran en dirección a la fase externa, mientras en la emulsión aceite en agua sucede lo contrario.

Las emulsiones se pueden clasificar en tres grandes grupos:

I.- Emulsiones aceite en agua (O/W), en éstas el aceite es disuelto en micelas en una fase acuosa continua.

II.-Emulsiones agua en aceite (W/O), la fase acuosa esta disuelta dentro de micelas en la fase oleosa (Fig. 6).

III.-En este tipo de Emulsiones la fase acuosa y oleosa están en equilibrio con una tercera fase rica en tensoactivo comúnmente llamada fase media. Se conocen como estructuras bicontinuas [46].

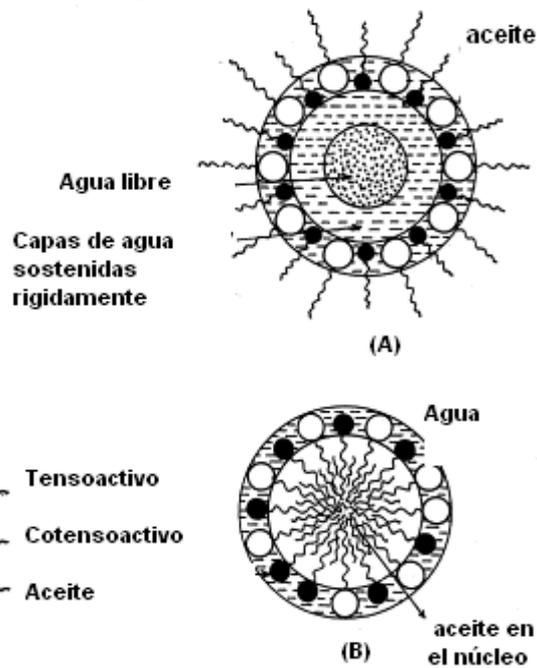


Figura 6. Representaciones de emulsiones (A).- W/O y (b).- O/W

Los diagramas ternarios, o de Gibbs, se describen como la representación gráfica del comportamiento de una propiedad característica de una mezcla de tres componentes (Fig.7), donde se indica la proporción específica de cada componente en un punto determinado de composición y temperatura.

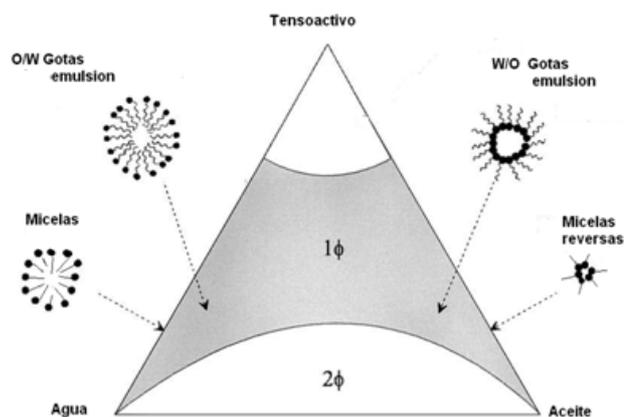


Figura 7. Representación de un hipotético diagrama de fases pseudo ternario de un aceite / tensoactivo/ agua.

Esta representación gráfica (Fig. 8) es un esquema triangular donde cada vértice representa a un componente puro o mezcla. La escala que recorre cada una de las caras del triángulo indica la relación fraccionada entre los componentes del correspondiente sistema binario, en cualquier punto dentro del área del diagrama se define la proporción de cada componente en el sistema ternario (A-B-C) [46].

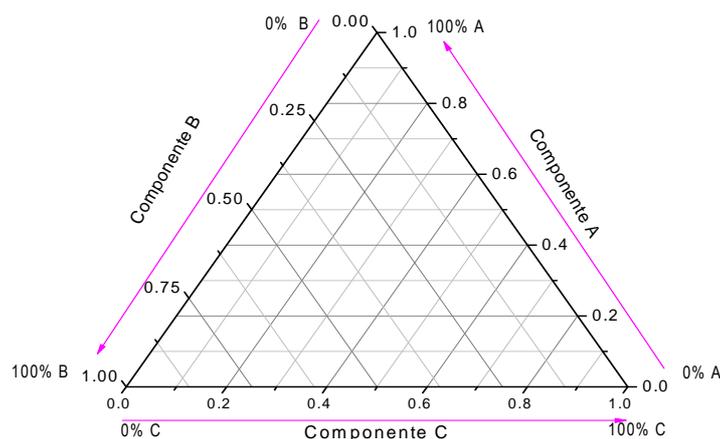


Figura 8. Diagrama de Gibbs

La formación de nanopartículas por el método de emulsión-difusión se inicia con la formación de una emulsión aceite/agua entre un disolvente parcialmente soluble en el agua (en este disolvente se encuentran disueltos el polímero y el fármaco) y una fase acuosa saturada del disolvente que puede contener uno o varios estabilizantes. La adición de agua a la emulsión provoca rompimiento del equilibrio y la salida del disolvente a la fase continua, provocando la agregación del polímero sobre el aceite en forma de nanocápsula [47-52].

Influencia de la Hidrofobicidad del polímero

La emulsificación de soluciones orgánicas de polímeros como policaprolactona (PCL), ácido polilactico-glicolico (PLGA) o polimetil metacrilatos de amonio (Eudragit) en soluciones acuosas seguidas de la evaporación de los solventes es el método más común de síntesis para nanopartículas.

El paso crucial en este método es la emulsión, la actividad interfacial de polímeros hidrofóbicos en los límites agua/aceite y la viscosidad de soluciones orgánicas de estos polímeros afectan el tamaño de las gotas de la emulsión y en consecuencia el tamaño, resultando micro y nano partículas después de la evaporación del disolvente.

El tamaño nano es muy importante porque es el parámetro responsable de distribución de fármaco, absorción y actividad biológica después de la administración.

El efecto de la estructura molecular de los polímeros hidrófobos y su actividad en la interfase de cloruro de metileno/agua, así como el tamaño de las nanopartículas obtenidas por la técnica de emulsión-evaporación, fue estudiada por Chernysheva, *et al.* Proporcionando la siguiente información:

La tensión interfacial es de importancia primordial con respecto a la viscosidad. Los polímeros Eudragit, que exhiben la tensión interfacial más baja, rinden partículas más pequeñas.

La baja tensión interfacial obtenida con polímeros de Eudragit puede explicarse con la ionización de los grupos hidrofílicos de amonio cuaternario, que pueden ser hidratados. La desorción de estos grupos hidrofílicos en la solución de cloruro de metileno implica una disminución en entalpia y el polímero es adsorbido irreversiblemente en la interfase aceite/agua.

Por otra parte los polímeros PLGA, PCL no tienen grupos hidrófilos ionizables por lo que no hay descenso en la tensión interfacial [53].

Por otra parte, Quintanar et al, nos indica que el tamaño de partícula es influenciado por la concentración de polímeros, velocidad de agitación y concentración del tensoactivo. Otras variables como la viscosidad, pH de la fase externa, relación fase externa/interna tienen un efecto limitado en el tamaño de las nanopartículas [48].

Influencia de la concentración de polímero

La concentración de polímero también fue estudiada por Hye-Young Kwon *et al*, quienes mantuvieron la concentración del estabilizante, PVA, al 2.5 (m/V%) y variaron la concentraciones de PLGA, la información que proporciona es que a mayores concentraciones de polímero el tamaño de partícula es mayor. Debido a que la concentración del polímero en la fase interna es un factor crucial en el incremento del tamaño de partícula; por otra parte al incrementar la concentración del polímero se incrementa la viscosidad de la solución orgánica, la alta viscosidad obstaculiza el corte y por lo tanto se ve influenciado el tamaño de la nanopartícula [54].

Influencia de la fase orgánica

La naturaleza de la fase orgánica afecta al tamaño final de las nanopartículas. Esto fue demostrado por Choi *et al*, al utilizar acetato de etilo y metil-etil-cetona se obtuvo un tamaño de 120nm y 125 nm respectivamente. Las nanopartículas de tamaño mayor de 260 nm se obtuvieron con alcohol bencílico. Probablemente estos resultados se deben a la polaridad del disolvente orgánico. Estos experimentos se llevaron a cabo con una concentración constante de PLGA DE 2 % (W/V) [55].

Influencia de la fase acuosa

El porcentaje de agua adicionado para permitir la difusión del disolvente fue estudiado por Kwon *et al*. Éste encontró que no hay diferencia considerable al adicionar diferentes porcentajes. Cuando se trabajó con bromuro de dimetil didodecil amonio (DMAB) el tamaño medio fue de 76 – 78 nm a 0.03 mL/s, al comparar con PVA este fue de 220 nm y 204 nm en 0.03 mL /s y 16 mL/s respectivamente[55], lo cual significa que el sistema trabajado a esas condiciones no se ve afectado por el volumen de agua para la difusión del disolvente [55].

Influencia del estabilizante

En el método de emulsión-difusión la estabilización de las gotas después del proceso de difusión previene la coalescencia y la formación de aglomerados. Al formarse la interfase la manera de disminuir la energía del sistema y prevenir la coalescencia es el uso de estabilizadores.

Varios estabilizadores son seleccionados en base a su propósito farmacéutico, ejemplo de ello es el tween 80, gelatina, dextran (PM 6000), pluronic L-63 y PVA. Los tensoactivos cerca de la concentración micelar crítica (CMC) forman micelas. En sistemas de tensoactivos no iónicos la partícula es estabilizada por efecto estérico, pero en sistemas de tensoactivos iónicos la partícula no solo es estabilizada por efecto estérico sino también por repulsión electrostática.

En el trabajo de Hye-Young Kwon *et al*, se comparó el uso de PVA y bromuro de dimetil didodecil amonio (DMAB). El valor de HLB (balance lipofílico hidrofílico) utilizado para la emulsión fue de un intervalo de 18 a 20. Para explicar la diferencia entre el PVA y DMAB midieron la CMC y la solubilización del pireno. Los resultados indican que con DMAB se obtiene un menor tamaño de partícula, la solubilización del pireno es más alta y que la CMC se obtiene a un valor menor con respecto al PVA. Esto significa que el DMAB forma agregados a baja concentraciones con respecto al PVA [54].

Otro ejemplo de la influencia del estabilizante fue estudiada por Kwon *et al*. El tamaño medio de las nanopartículas fue de 76 nm para una concentración de 2% (w / v) de DMAB. El tamaño promedio utilizando PVA fue de 210 nm para el 5% (w / v). Cuando la concentración del DMAB se aumentó de 2 a 4% (w / v), se observó una ligera disminución en el tamaño de la nanoesfera (de 80 nm a 75 nm). La disminución del tamaño de las nanopartículas formadas con DMAB se atribuye a la reducción de la tensión superficial comparada con la del PVA, 22 dina/cm al 0.01% (w/v) para DMAB y 37 dina/cm al 1% (w/v) para PVA.[55]

Influencia de la temperatura

La temperatura del agua y su efecto en la elaboración de nanopartículas también fue estudiado por Hye-Young Kwon *et al*.

La difusión es otro importante factor que influye en el tamaño de partícula: Stokes-Einstein propusieron el coeficiente de difusión de la siguiente manera:

$$D_{AB} = \frac{kT}{6\pi r \eta_B}$$

Donde D_{AB} ($\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$) es el coeficiente de difusión, k ($=1.380 \times 10^{-3} \text{JK}^{-1}$) es la constante de Boltzman, T (K) es la temperatura en Kelvin, r es el radio hidrodinámico y η_B es la viscosidad de la fase continua.

El coeficiente de difusión es proporcional a la temperatura del sistema y el efecto de la fase continua es inverso. El tamaño de partícula de PLGA disminuyó al aumentar la temperatura del agua adicionada. Debido a que la temperatura promueve la difusión, el tamaño de la partícula disminuye. Esto significa que la rápida evaporación del solvente favorece la precipitación del polímero, formando así la nanopartícula [54].

3.2.3.2 Caracterización de Nanopartículas

La caracterización de las nanopartículas obtenidas por cualquier de los métodos anteriores es necesaria para controlar la calidad y homogeneidad de éstas. Dentro de las principales pruebas que se le hacen a las nanopartículas se encuentran:

3.2.3.2.1 Tamaño de Partícula

Esta técnica se realiza por medio de PCS (Espectroscopia de correlación de fotones) o LD (Difracción láser). En el primer caso la evaluación de la fluctuación de la intensidad de la dispersión de la luz está dada por el movimiento de las partículas. En el caso de LD se fundamenta en el ángulo de difracción de la luz originado por las partículas.

Este parámetro es importante conocerlo porque del mismo depende el reconocimiento o no por el sistema inmunológico, además de que influye fuertemente sobre el proceso de liberación y sirve como modo de control de calidad.

3.2.3.2.2 Potencial Zeta (ζ)

El potencial zeta es una medida que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión de los coloides. Esta medición se basa en la movilidad electroforética. Por otra parte, si la carga en la superficie es alta (mayor a +30 o menor a -30), se producen fuerzas electrostáticas de repulsión, manteniendo a las partículas dispersas, si la carga es baja, el coloide tiende a la aglomeración y al sedimento [56].

3.2.3.2.3 Morfología

Para la determinación de la morfología se hace uso de la Microscopia electrónica que emplea un haz de electrones que incide sobre la muestra. Este bombardeo de electrones provoca la aparición de diferentes señales captadas con detectores pudiéndose proporcionar la naturaleza de la muestra, así como su tamaño y forma [13].

3.2.3.2.4. Comportamiento térmico

En esta técnica se mide la diferencia del flujo de calor entre la muestra y la referencia cuando ambas se someten a un programa de temperatura en una atmósfera controlada. La información que proporciona este tipo de análisis incluye: la cristalinidad de la muestra, así como algunas características de interacción fármaco-excipientes (por ejemplo en nanopartículas) y se puede presentar la desaparición, disminución y corrimiento de picos de fusión u otros procesos dependientes de la temperatura [13].

3.2.2.2.5 Espectroscopia IR

La espectroscopia infrarroja se basa en el hecho de que las moléculas tienen frecuencias a las cuales rotan y vibran, es decir, los movimientos de rotación y vibración moleculares tienen niveles de energía discretos. Prácticamente todos los compuestos moleculares pueden manifestar una serie de bandas de absorción, cada banda corresponde con un movimiento de vibración de un enlace en concreto dentro de la molécula: el conjunto constituye la huella dactilar del compuesto[13].

En una mezcla, esta técnica puede dar cierta información sobre la relación entre moléculas de diferente naturaleza.

3.2.3.2.6 Espectroscopia RMN (Resonancia Magnética Nuclear)

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica empleada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares, aunque también se puede emplear con fines cuantitativos. Se basa en las propiedades mecánico-cuánticas de los núcleos atómicos.

Esta técnica nos permite identificar picos característicos de los compuestos de interés y saber si se encuentran presentes en las nanopartículas.

IV.-Objetivos

Objetivo General

Obtener, caracterizar y evaluar las nanopartículas (Np) de PLGA- ivermectina, y el Gel de PEG 6000- Acido metacrilico / ivermectina y closantel.

Objetivos Particulares

- 1.- Realizar el diagrama ternario para la elección de la emulsión a usar.
 - ❖ Emplear la técnica de emulsión-difusión para la formación de nanopartículas de PLGA-ivermectina
 - ❖ Caracterizar el sistema nanométrico mediante técnicas analíticas.
- 2.-Elaborar un Gel de PEG 6000- Acido metacrilico/copolímero etil acrilato.
 - ❖ Estudiar la reología del gel obtenido.
- 3.- Estudiar la eficacia de los sistemas de liberación modificada elaborados Np y gel *in vivo*.

V.- Metodología

5.1.- Materiales Nanopartículas

El ácido poliláctico-glicólico (PLGA 50:50 PM 40000-75000), usado como polímero envolvente; el aceite de castor (triglicérido compuesto en su mayoría por el ácido graso ricinoleico (C18,) empleado para la formación del núcleo oleoso; Monoleato de sorbitan (20) polietoxilado (Tween 80) empleado como tensoactivo no iónico y emulsificador fueron comprados de Sigma-Aldrich. El Acetato de etilo (PM 88.1), grado analítico usado como disolvente parcialmente miscible en agua, fue adquirido de Baker Analyzed, México. La Ivermectina (lote 20030404) usada como principio activo fue donada por Laboratorios Aranda. El agua desionizada se obtuvo usando el sistema Nanopure Diamond, Barnsted.

Geles

Ácido metacrílico / copolímero etil acrilato utilizado para formar el gel con Polietilenglicol 6000 (PM 5000-7000, Fluka Chemika, Eur). Alcohol etílico absoluto (PM 46.0, Tecnología Industrial Analítica) grado reactivo, Agua desionizada usando el sistema Nanopure Diamond, Barnsted, empleados para la mezcla hidroalcohólica , Ivermectina y Closantel sódico como principios activos.

5.2. Elaboración de diagramas de fase

A 20 mL de la fase orgánica, acetato de etilo, se adicionan 0.35 mL de aceite de ricino (98:2 v/v).

Posteriormente, se toman 2 mL de esta mezcla y se adicionan 0.5 mL de Tween 80, a esta mezcla se le va adicionando agua en volúmenes de 0.5 mL, dejando agitar 5 minutos y reposando el mismo tiempo, hasta llegar al 50 % de agua, a partir de este punto se adicionó el agua de 1 mL en 1 mL hasta llegar aproximadamente al 80% de agua.

El procedimiento anterior se realizó en un baño NeslabRTE7® (Termo Electrón Corporation) a 25°C, con agitación a 300 rpm.

Este mismo procedimiento se repitió con las siguientes variantes Tween 80 (0.4mL) y 3 mL de mezcla (acetato de etilo/aceite de ricino), en ambos casos se realizó por duplicado.

5.3. Determinación del punto de inversión por la técnica de tamaño de glóbulo

Para realizar la determinación del punto de inversión de la emulsión W/O a O/W se seleccionaron puntos con características deseadas (con porcentajes de tween menores al 5 %) y se procedió a medir tamaño de partícula, posteriormente se realizó el gráfico de tamaño de partícula vs % de agua.

Se observó el punto de inflexión y las condiciones del mismo, el punto seleccionado que se caracterizó por asegurar que era o/w y tener la mayor cantidad de aceite y la menor de agua sirvió como sistema para la incorporación del polímero y fármaco para la elaboración de nanopartículas.

5.4.- Fabricación de nanopartículas

5.4.1. Nanopartículas de PLGA

Elaboración de la emulsión

Fase orgánica

A 20 mL de acetato de etilo se adicionaron 0.350 mL de aceite de ricino, se mezclaron y se incorporaron 30 mg de ivermectina y 150 mg de PLGA, se dejó en agitación lenta hasta observar la solubilización de estos últimos.

Fase acuosa

A 38 mL de agua se adicionan 2.68 mL de Tween 80, y se deja en agitación hasta su completa incorporación.

Obtención de nanopartículas

Se adiciona gota a gota la fase acuosa a la fase orgánica, manteniendo una agitación de 300 rpm por 10 min. Una vez finalizada la incorporación de la fase acuosa, homogenizar con ultraturrax a 10000 rpm 10 min. Posteriormente se adiciona un volumen de 100 mL de agua y se agita a 6000 rpm durante un minuto. El disolvente se evapora a una temperatura de 55°C por 15 minutos y se mantiene en agitación hasta la completa eliminación del acetato de etilo.

5.4.2. Nanopartículas de PLA

A 20 mL de acetato de etilo se adicionaron 0.35 mL de aceite de ricino, 60 mg de fármaco, 300 mg de ácido poliláctico (PLA). A un volumen de 40 mL de agua se adicionaron 1.5 mL de mezcla de tensoactivos o 0.96 g de Pluronic F-127, después se adiciona esta última fase a la fase orgánica lentamente (gota a gota), se mantiene en agitación por 10 min, a una velocidad de 10000 rpm con el Ultra turrax T18. Posteriormente se adiciona un volumen de 100 mL de agua, se agita por un minuto a una velocidad de 6000 rpm (Ultra turrax) y se elimina el disolvente, a una temperatura de 55 °C por un lapso de 15 min y posteriormente se mantiene en agitación por 20 min, a temperatura ambiente.

5.4.3.- Caracterización de nanopartículas

Análisis de tamaño de partícula

El promedio del tamaño de partícula e índice de polidispersidad fue determinado usando un Nanosizer (nano ZS ZEN 3600)® (Malvern Instruments, USA), las medidas se realizaron por triplicado. El fundamento de este análisis se basa en la interacción entre las partículas y el haz luminoso, provocando una difracción que produce patrones de intensidad de luz que son proporcionales al tamaño de la partícula provocando dispersión.

Determinación de Potencial Zeta

El potencial zeta de la suspensión de nanopartículas fue medido con un Zetasizer® (Malvern Instruments, USA),. Las mediciones se realizaron a 25°C por triplicado.

Lavado de las nanopartículas

Para la eliminación del Tween 80 el volumen total de la formulación se sometió a una velocidad de centrifugación de 30000 rpm utilizando la ultra centrifuga Beckman L7® por 30 min a una temperatura de 4 C, posteriormente se separó el sobrenadante y el botón se resuspendió con el volumen de agua igual al inicial.

Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

Se corrieron muestras individuales de PLGA 50:50, ivermectina y las Np obtenidas del sistema nanoparticulado. El equipo es marca Shimadzu DSC-60, calibrado con estándar de indio.

El comportamiento térmico fue estudiado por el calentamiento de aproximadamente 4.0 mg de cada muestra en celdas de aluminio, bajo una atmosfera de nitrógeno con un flujo de 30- 40 mL /min.

Teniendo en cuenta el punto de fusión del polímero e ivermectina, el intervalo de temperatura utilizado fue entre 25 y 300 °C con una velocidad de calentamiento de 5°C/min.

5.4.4 Concentración de Nanopartículas

La nanopartículas se concentraron por:

a) Filtro tangencial

El filtro tangencial utilizado fue un Labscale TFF system (Millipore), con una membrana de tamaño de poro de 200 nm, el cual fue lavado con NaOH 0.1M. Esta filtración se realiza sobre una membrana de forma que el líquido a filtrar discorra tangencialmente a la superficie filtrante y no solo perpendicularmente, de tal forma solo una fracción atraviesa la membrana.

b) Liofilización

Para poder eliminar el excedente de agua por congelación y posterior sublimación del hielo en condiciones de vacío se utilizó la Liofilizadora Labconco (Triad™), la temperatura de precongelado fue de -75°C, y las condiciones de liofilización fueron, tanto para desecación primaria como secundaria, de -20°C, a un vacío de 0.040 mBar.

c) Centrifugación

Para poder obtener el sedimento de la solución se empleó la ultra centrifuga Beckman L7® a 30000 rpm, obteniéndose un sedimento constante después de 45 minutos.

5.5. Elaboración del Gel

Se realizó una mezcla hidroalcohólica para lograr disolver la ivermectina y mantener el closantel en una suspensión estable. A 10 mL de esta mezcla se agrega 1 mL de una suspensión de ácido metacrílico/copolímero etil acrilato al 10% w/v y 2 mL de PEG 6000 al 20% w/v, se agita hasta la disolución completa y se observa una solución transparente, posteriormente se agregan la Ivermectina y el Closantel.

5.5.1 Caracterización del gel

Las reología del gel se llevó a cabo empleando un Reómetro AR2000 de esfuerzo controlado, equipado con una geometría de cono y plato con 1° y 60 mm de diámetro para las condiciones de estudio. Todas las pruebas se realizaron al menos por duplicado, y a 25 y 37 °C. Las pruebas reométricas fueron analizadas tanto en flujo de cizalla simple en una ventana de 1 a 300 1/s, como en flujo de cizalla oscilatoria a una ventana de deformación de 1 a 250 rad/s, en estas pruebas previamente se determinó la región de viscoelasticidad lineal (<20%) para cada una de las condiciones estudiadas. En las pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud de deformación se siguió la evolución de los módulos G' (de almacenamiento) y G'' (viscoso), estos análisis proporcionan la respuesta del material sin romper las estructura del mismo.

VI.- Resultados y discusión

6.1. Diagramas de fase

Se realizó el diagrama de fase ternario para conocer las posibles microestructuras de los sistemas dispersos que pueden fungir como horma para elaborar las nanopartículas. Se eligió como disolvente del fármaco y del polímero una mezcla al 98:2 v/v acetato de etilo/aceite de ricino y como estabilizante el tween 80, basado en solubilidad y toxicidad de los componentes.

A continuación se muestra el diagrama de fases obtenido (Fig. 9)

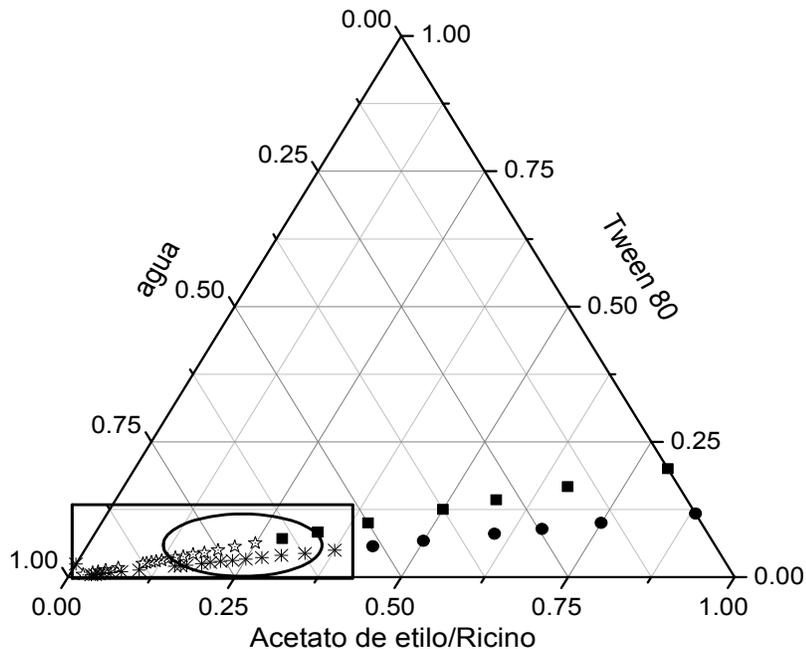


Figura 9. Diagrama de Fases obtenido de la mezcla (acetato de etilo aceite de ricino, agua, y tween 80 V/V). Línea superior correspondiente a la composición inicial de 0.5 mL de tween 80 y mezcla orgánica 2 mL, línea inferior corresponde a 0.4 mL de tween 80 y 3mL de mezcla orgánica.

El diagrama muestra la existencia de una fase L1, emulsión aceite en agua y una fase L2, emulsión agua en aceite. La fase L2 aparece en la región con menor cantidad de agua en el sistema (■ y ●) y se invierte al ir haciendo la titulación (* y ☆).

Al aumentar la cantidad de tensoactivos se favorece la formación de emulsiones o/w (L1), ya que es conocido que los agentes de superficie con altos HLB, mayor afinidad por el agua, tienden a formar más fácilmente sistemas con la fase externa acuosa (ley de Bancroft).

En el área seleccionada el sistema se comporta como una emulsión uniforme y estable (sin separación de fases). Por otra parte se puede ver que se tiene bajas cantidades de la mezcla orgánica y un alto volumen de agua, por lo que probablemente indicaría una emulsión tipo o/w, para corroborarlo se procede a medir el tamaño de partícula para determinar el punto de inversión de fase.

6.2. Tamaño de glóbulo

Para llevar a cabo el estudio de inversión de fases se procedió a la técnica de tamaño de partícula. Ésta consiste en realizar medidas del diámetro hidrodinámico de los glóbulos en las diferentes composiciones a lo largo de las líneas estudiadas en el diagrama de fases. El tamaño irá aumentando al realizar la titulación con agua, hasta llegar a un punto de inflexión que nos indicará el cambio de fases, es decir la fase interna pasa a ser fase externa.

A continuación se muestran las gráficas obtenidas para este estudio (Figura 10 y Figura 11).

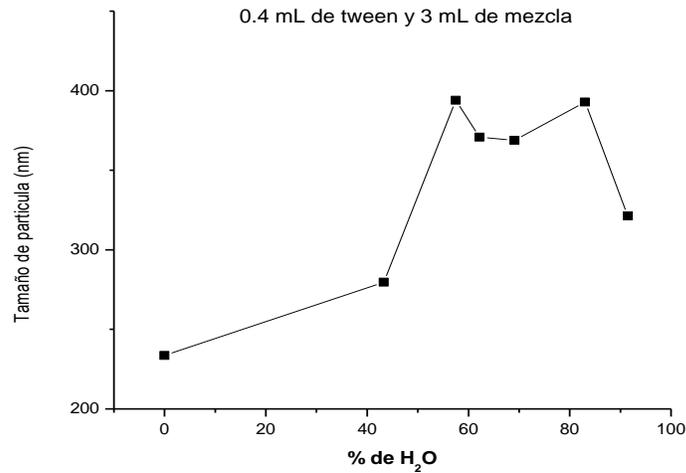


Figura 10. Efecto de la cantidad de agua sobre el tamaño de los glóbulos de la emulsión para el sistema con 0.4 mL de tween 80.

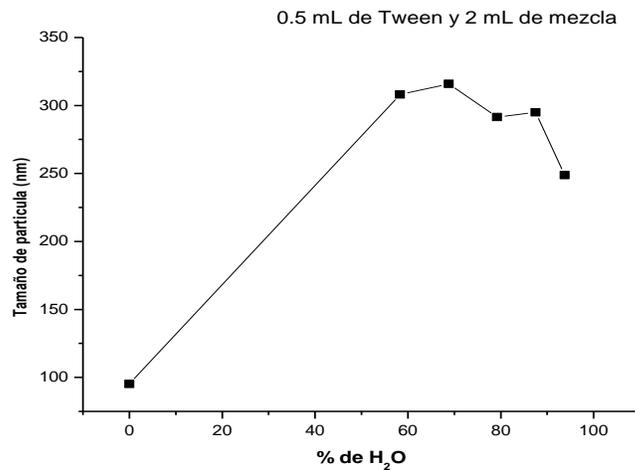


Figura 11. Efecto de la cantidad de agua sobre el tamaño de los glóbulos de la emulsión para el sistema con 0.5 mL de tween 80.

En la figura 10, se observa que el cambio se da a partir de 57.5% de agua; mientras que en la figura 11 dicho cambio ocurre a 68.8%. Es evidente que en el segundo caso el tamaño de gotícula es inferior que el primero, lo que se justifica por la mayor cantidad de Tween 80 en relación con la fase interna (fase oleosa), pudiendo de esta modo generar un sistema más estable ante la sedimentación, generando glóbulos de menor tamaño (ley de Stokes).

Considerando que la horma debe ser o/w para cobijar en la fase interna tanto el polímero como el fármaco, es necesario elegir la composición de menor tamaño y mayor cantidad de fase oleosa; para lograr incluir la mayor cantidad posible de polímero y principio activo. Así, se eligieron dos composiciones para iniciar la elaboración de las nanopartículas: 62.2 agua: 33.3 fase orgánica/4.4 tween 80 y 79.2 agua: 16.7 mezcla orgánica/4.2 tween 80. Para comprobar que nuestro sistema soporta 60 mg de ivermectina (dosis aproximado para un animal de 250 kg) se realizaron las pruebas de solubilidad del PLGA 50:50 y de la ivermectina en los sistemas seleccionados; de manera individual y como mezcla. Los resultados mostraron que el sistema tiene la capacidad de soportar en disolución 200 mg de polímero y 900 mg de ivermectina en 3mL de la mezcla oleosa (acetato etilo/ aceite de ricino 98:2)) de forma individual.

Con los datos anteriormente recabados se lleva a cabo la formación del sistema de talla nanométrica, finalmente se trabajaron con las siguientes cantidades (Tabla 6):

Tabla 6. Formulación final para Np de PLGA

Formulación	
Componente	Cantidad
Ivermectina	60 mg
PLGA 50:50	300 mg
Aceite de ricino	0.350 mL
Acetato de etilo	20 mL
Tween 80	2.76 mL
Agua	37 mL

Para obtener el mejor sistema de trabajo se realizó la formulación según la metodología señalada anteriormente (ver Fabricación de Np de PLGA) pero variando el calentamiento para la evaporación del disolvente, con el objetivo de observar si la temperatura afecta al sistema, las temperaturas fueron 55°C y/o 25°C por 15 y 60 minutos y posteriormente se deja en agitación por 12 horas más

a temperatura ambiente. Al terminar este periodo de tiempo, las formulaciones a 25°C presentaban precipitados de polímeros, posiblemente debido a que la eliminación del disolvente fue más lenta provocando un tiempo de contacto mayor del polímero con el agua, en los sistemas a 55 °C se observa ausencia de sólidos. Por otra parte la difusión del acetato se ve influenciada por la temperatura de manera proporcional, favoreciendo la formación de nanopartículas de menor tamaño [54].

6.3. Caracterización de las nanopartículas

Para tener información sobre las características del sistema elaborado, se procedió a la caracterización del mismo.

6.3.1. Tamaño de partícula y potencial zeta

Como se observa en la tabla siguiente (Tabla 7), el tamaño de las nanopartículas (vacías sin fármaco) es menor con respecto al sistema con ivermectina, indicando probablemente que el fármaco fue encapsulado. Este sistema tiende a disminuir en tamaño cuando el tensoactivo es eliminado [57-59].

Tabla 7. Tamaño de partícula y potencial zeta para nanopartículas con y sin fármaco, antes y después de ser lavadas.

	Tamaño (nm)	Potencial
Np con tensoactivo	425	-6.83
Np vacías con tensoactivo	400	-7.56
Np lavadas	385	-9.24
Np vacías lavadas	375	-8.86

La distribución de tamaño de partícula se comportó como una típica campana de Gauss, con un promedio de tamaño de aproximadamente 400 nm, el índice de polidispersión es de 0.25, valor aceptado para estos tipos de sistemas ya que es menor a 0.5[58](Fig. 12).

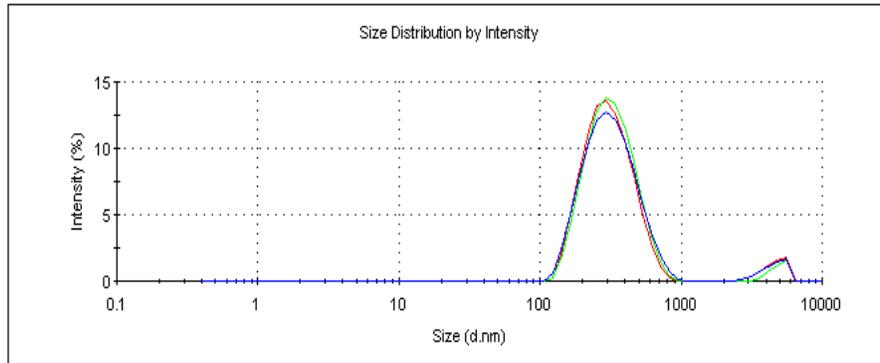


Figura 12. Distribución de tamaño de partícula de la solución coloidal

El potencial zeta de referencia tomado fue el de N_p vacías y lavadas (sin ivermectina y tween 80), este valor fue comparado con el sistema con fármaco y lavado obteniéndose una diferencia mínima debido posiblemente a una pequeña presencia del endectocida en la superficie. Sin embargo el valor obtenido indica inestabilidad en el sistema y que hay que proponer una alternativa para modificar el potencial para hacerlo más estable.

Esta información indica la posibilidad de utilizar estos nanoacarreadores para sistemas de liberación vía parenteral.

Una vez obtenido el sistema se procede a concentrar las nanopartículas para obtener un volumen menor y poder ser administrado al bovino sin tener que inyectarle grandes cantidades.

a) *Filtro tangencial*

El filtro tangencial no provocó una disminución notable del volumen de la solución con nanopartículas, esta reducción de volumen fue menos del 10% después de 24 horas, una desventaja que se presentó fue que después de cierto tiempo el filtro se saturaba y se tenía que enjuagar y reiniciar el sistema.

b) *Liofilizadora*

Se llevó a cabo llevando a cabo la congelación de dos diferentes modos. Primero, haciendo una congelación rápida con N_2 líquido para evitar reorganización del sistema y segundo, dejando que la liofilizadora llevara a cabo el proceso de

congelación, el cual hace bajo presión ambiental y aproximadamente en tres horas. Para el proceso de liofilización se varió el paso de congelación de la muestra: utilización de nitrógeno líquido y sin congelar. Observándose en ambos casos un sólido blanco y presencia de Tween 80.

c) Centrifugación

Al centrifugar el sistema se obtuvo, un sedimento blanco y un sobrenadante turbio, el botón se resuspendió en agua destilada para su lavado, se repitió el proceso y el segundo botón se traspaso a un vial y se resuspendió con 10 mL de agua desionizada. Este método presentó la ventaja de la eliminación casi por completo del Tween 80 y disminución del tiempo, por lo que fue seleccionado para llevar a cabo la concentración del preparado.

6.3.2. DSC

Con la finalidad de conocer si la ivermectina se encuentra libre en el medio dispersante o incluida en el nanosistema, se procede a hacer estudios de Calorimetría diferencial de barrido (DSC-60 Shimadzu), los cuales se muestran en la figura 13.

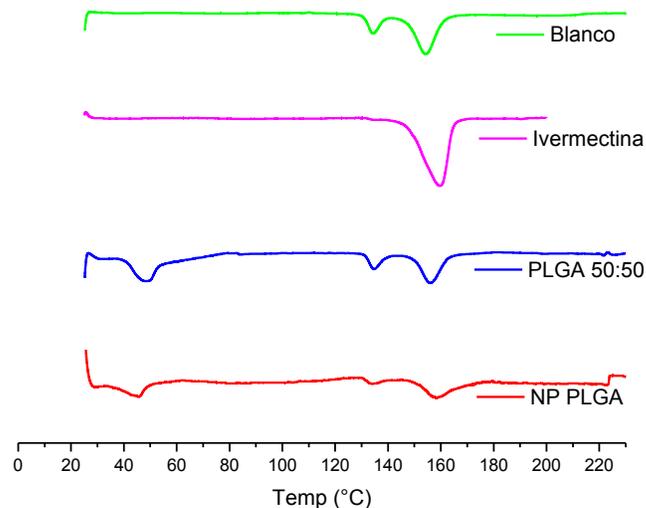


Figura 13. Termogramas de las materias primas y Np.

En los termogramas se aprecia la transición vítrea típica de polímeros amorfos alrededor de 44°C presente en la muestra de PLGA 50:50 [60, 61]. Misma que se ve en las nanopartículas cargadas de Ivermectina, pero en menor intensidad. Por

otro lado, la ivermectina muestra un pico endotérmico de fusión a 160 °C, el cual se observa también en la muestra blanco ya que el detector lo presenta como impureza. La ivermectina en las nanopartículas parece encontrarse en pequeña cantidad, lo cual implica que una parte de ésta se encuentra disuelta dentro del sistema nanoparticulado.

Tabla 8. Información proporcionada por el DSC

	Ivermectina	PLGA (Tg)	NP PLGA(Tg)	Blanco	NP PLGA(Tf ivermectina)
Pico	159.70	45.68	45.58	158	154.37
inicio	150.45	43.15	45.48	157.58	146.79
Final	164.29	48.51	47.60	158.81	161.42
ΔH	-213.25 mJ -73.53 J/g	-14.62 mJ -6.09 J/g	-2.57 mJ -0.73 J/g	-12.06 mJ -3.45 J/g	-32.89 mJ -13.70 J/g
Peso	2.9 mg	2.4 mg	3.3 mg		

Por otra parte al comparar las entalpias esperadas de la ivermectina con la presente en las Np solo se obtiene cantidades correspondientes al 50%, esto indica que al menos un 50% del principio activo se encuentra a nivel molecular en las nanopartículas.

6.3.3 IR

Con el fin de saber si la ivermectina y el principio activo están presentes en las NP, se caracterización las materias primas y el sistema nanoparticulado por espectroscopia de infrarrojo por transformadas de Fourier que permite ver las huellas dactilares de cada sustancia.

En la figura 14 se observan las señales de vibración de los principales grupos funcionales del polímero, ivermectina, y aceite, encontrando como vibraciones comunes C=O de los grupos éster, y carboxilatos, C-O de éter, señales que aparecen aproximadamente en 1735, 1715 y 1150-1070 cm^{-1} respectivamente. También se aprecian metilos y metilenos presentes en las 3 sustancias alrededor de 2935-2915 cm^{-1} , y por lo que respecta a los grupos OH, éstos se observan alrededor de 3400 cm^{-1} ,

Estas coincidencias en grupos provoca traslapes y evita diferenciar señales características de cada sustancia. En consecuencia al comparar con el espectro del botón (Np PLGA) las señales se ven más intensas debido a que los grupos comunes presentes en principio activo, PLGA y aceite de ricino causan un efecto aditivo.

Por consiguiente se debe proceder a otra técnica para confirmar la presencia de ivermectina.

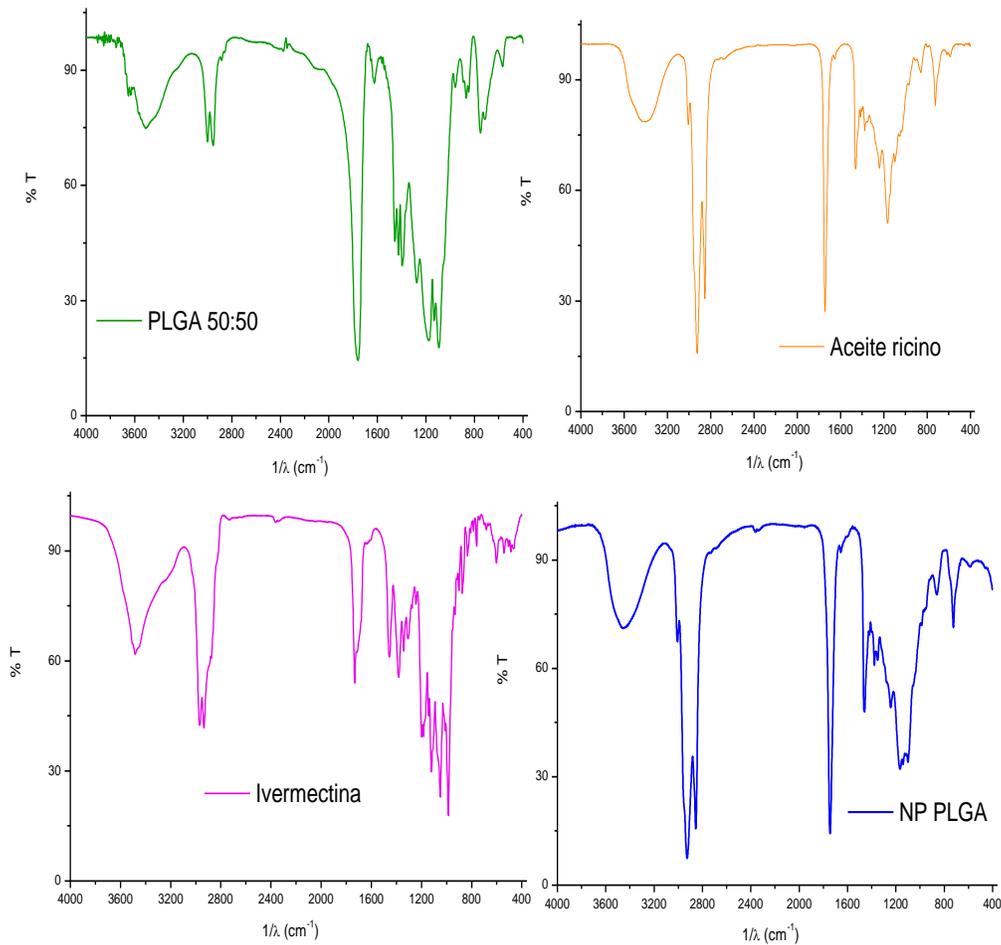


Figura 14. Espectros FTIR correspondientes a PLGA 50:50, aceite de ricino, ivermectina y NP PLGA.

Para observar la efectividad de los lavados y asegurar que el tween queda en ellos, se comparó el espectro de tensoactivo con el sobrenadante. En la figura 15 se observan que las señales de ambos espectros son casi iguales tanto en

intensidad como en la frecuencia en la que aparecen, lo que indica que se tiene solo tween 80 en el sobrenadante.

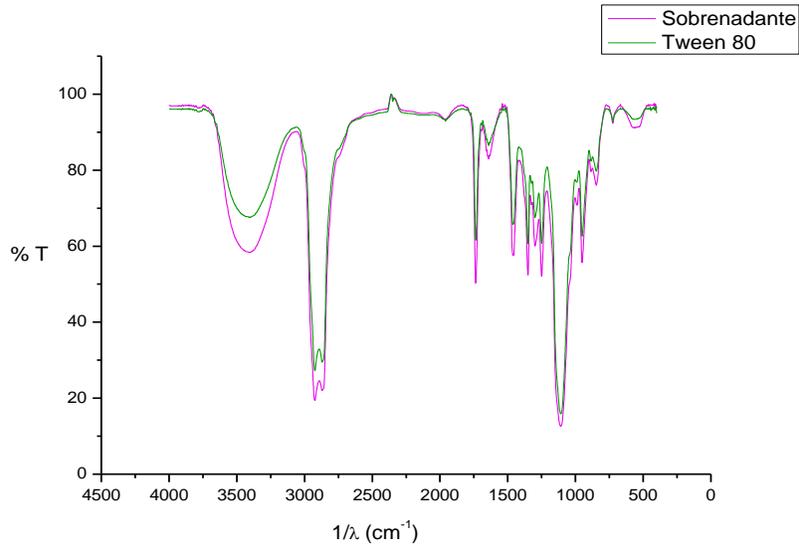


Figura 15. Espectros infrarrojos del tensoactivo y sobrenadante

6.3.4 Cromatografía en capa fina

Una técnica que permite saber si el endectocida se encuentra presente en botón y el sobrenadante (sb) es la cromatografía en capa fina. La placa que se muestra a continuación muestra las manchas obtenidas del botón y sb, teniendo como estándar a la ivermectina.

Al comparar los R_f se observa que son similares por lo que se puede concluir que el principio activo está presente en las Np y en el sb. La intensidad de la mancha producida por el sobrenadante es mucho menor con respecto al botón, indicando que su concentración de ivermectina también lo es. Su presencia podemos asociarla al remante que queda al decantar el agua del lavado (Fig. 16).

Fase móvil: Acetato de etilo y hexano
98:2

Fase estacionaria: Sílica gel

$Rf_B=0.5$

$Rf_{IV}=0.45$

$Rf_{sb}=0.45$

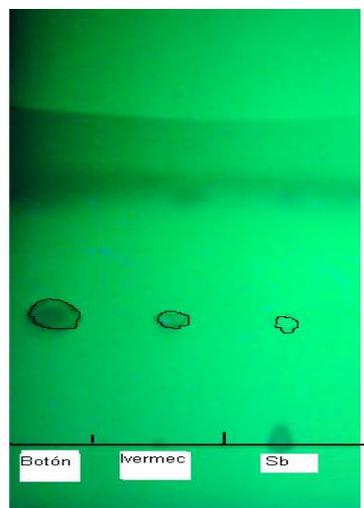


Figura 16. Cromatoplasmas de Botón, sobrenadante y principio activo.

6.3.6. Resonancia magnética nuclear

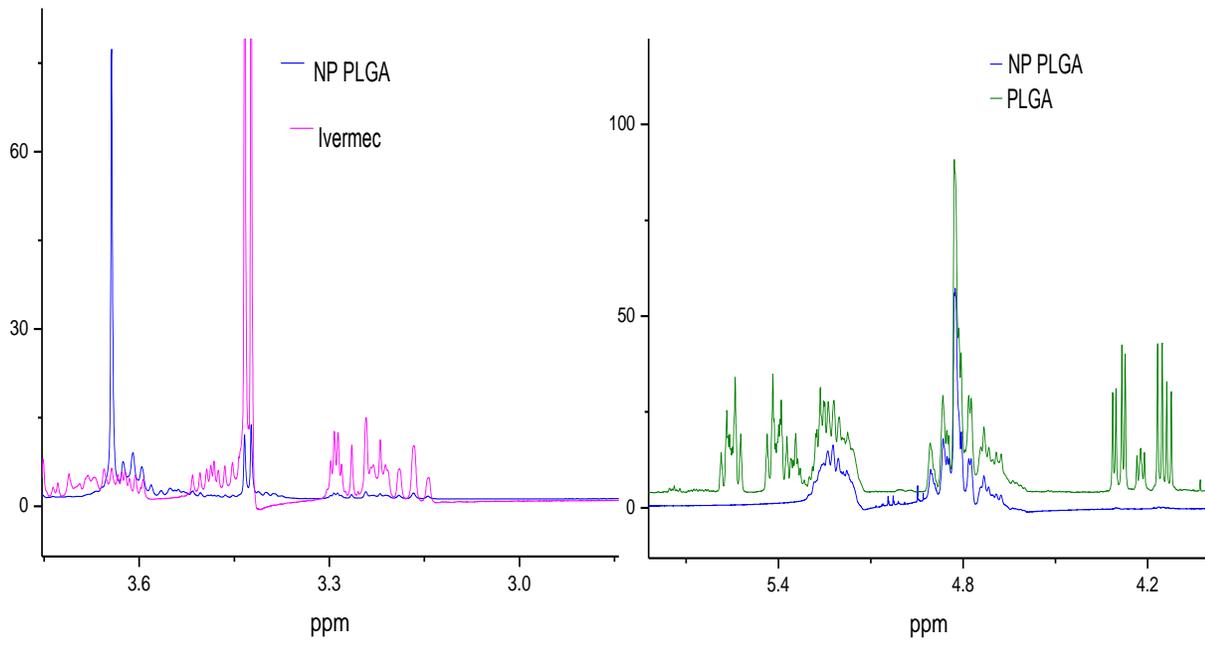
Para confirmar la presencia de la ivermectina y aceite en la NP y por lo tanto del polímero, así como la eliminación de la mayor cantidad de tween por medio de los lavados, se llevo a cabo 1H -RMN.

Obteniéndose los siguientes espectros (Fig. 17):

En el inciso (a) de la figura 17 el doblete observado a 3.4 ppm corresponde a los protones del grupo metoxi presente en la ivermectina, que a su vez se confirma su señal en las Np.

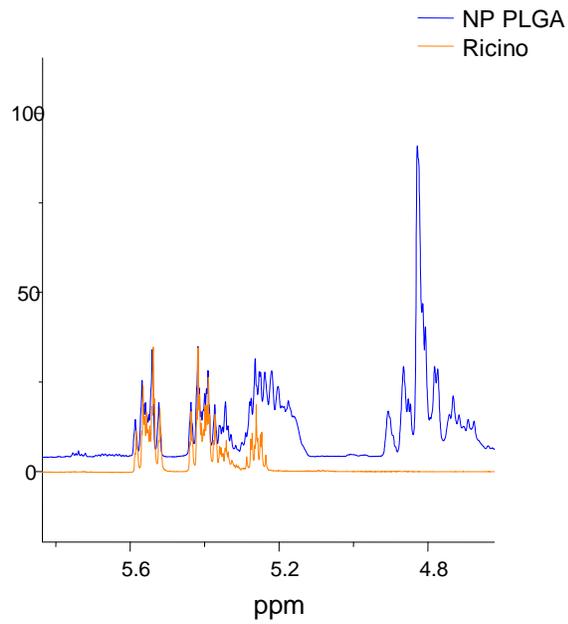
Con respecto al polímero (b) se observan señales características de 4.8 a 5 ppm pertenecientes a los protones de los metilos de ácido láctico que forman parte de los bloques del PLGA.

Los protones unidos al doble enlace de los ácidos grasos del aceite de castor se aprecian en 5.6 ppm (C)



(A)

(B)



(C)

Figura 17. Presencia de las principales señales de ivermectina, PLGA y aceite en el sistema Nanoparticulado.

En cuanto al Tween 80, el seguimiento se hizo a los protones de los metilos presentes, con señales que se observan en 3.62-3.75 ppm.

Cabe resaltar que se siguen estas señales porque no presentan ningún traslape con protones de las otras materias primas, además de ser características en cada sustancia.

La información anterior indica que el sistema contiene a la ivermectina y al aceite de castor.

Al comparar las Np lavadas y sin lavar se observa que las señales se intensifican y se definen más al eliminar el tensoactivo, y que la señal característica del tween (3.62-3.75 ppm) se ve disminuida, lo cual implica que una pequeña cantidad de tensoactivo se queda adsorbida entre las cadenas hidrofóbicas de la superficie de la nanopartícula (Fig. 18).

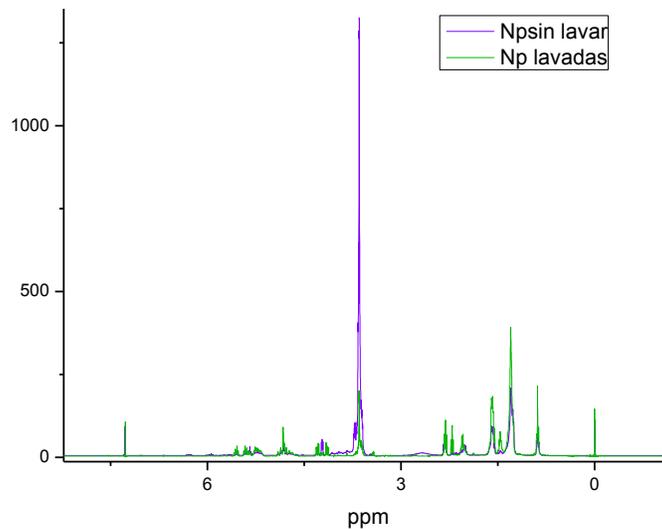


Figura 18. Efecto del lavado de las NP PLGA

En la figura 19 se sobreponen los espectros del tween y del Sobrenadante se aprecia que las señales aparecen a las mismas ppm y la intensidad es casi igual en ambos casos, además de que las señales de aceite de castor, ivermectina y polímero están ausentes o implican muy bajas concentraciones, que el equipo apenas las detecta (< 10 mg), indicando que la sustancia que se encuentra en el agua es principalmente el tensoactivo.

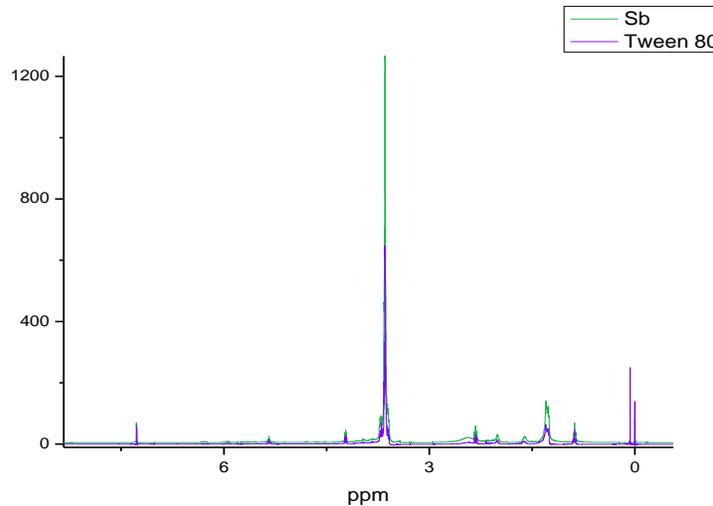


Figura 19. Espectro de Sobrenante con Tween 80

6.3.5 SEM

Este análisis se utiliza para confirmar la morfología de las partículas y tamaño de las mismas. En este barrido se pueden observar esferas de diferentes tamaños (Fig. 20) confirmando el comportamiento bimodal mostrado al medir tamaño de partícula (poblaciones mayores a una micra y menores a este valor). Por otra parte se realizó un seguimiento de oxígeno para poder inferir si se tiene una nanoesfera o una nanocápsula indicando una mayor concentración de este elemento en las orillas que en el centro (Fig. 21). Con esta información se confirma que con el método empleado se obtienen nanocápsulas.

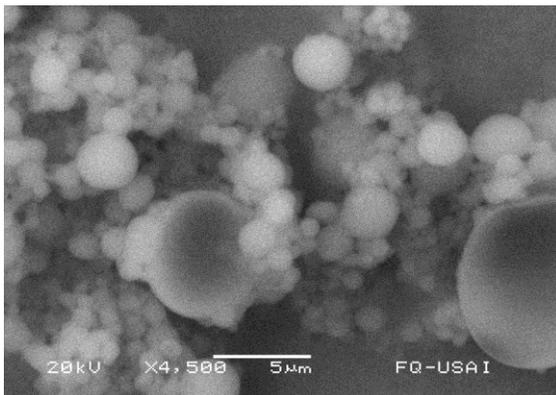


Figura 20. Micrografía obtenida por SEM del la Nanopartículas de PLGA en suspensión en agua una vez lavadas

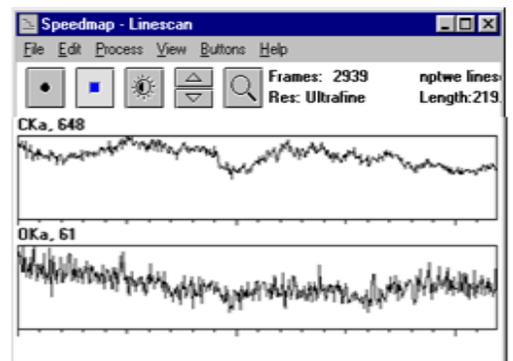


Figura 21. Seguimiento de extremo a extremo de la nanopartícula con carbono y oxígeno.

6.4 Reología del Gel

El pH del gel de PEG 6000- Acido metacrilico / copolímero etil acrilato con closantel e ivermectina en un medio hidroalcoholico fue de 7.2, proporcionándonos así condiciones adecuadas para la administración subcutánea.

Éste se caracterizó con el Reómetro TA instruments AR 2000, demostrando las siguientes propiedades: en los experimentos oscilatorios, se observa un comportamiento más como un líquido que como un sólido como lo podemos ver en la figura 22, en donde el módulo viscoso (G'') se encuentra arriba de módulo elástico (G'), esto ocurre a todas las frecuencias, ya que ambos módulos se comportan casi paralelos entre ellos. Por otro lado, en los estudios de cizalla simple, al graficar la viscosidad vs a la velocidad de corte, se puede observar que el gel muestra un comportamiento pseudoplástico, ya que la viscosidad disminuye conforme aumenta la rapidez de deformación (Fig. 23).

En la figura 24 se observa que la velocidad de corte es quien afecta directamente a la viscosidad del gel, ya que los valores de este parámetro aumentan conforme disminuye el flujo, lo anterior es muy importante pues la capacidad de la jeringa así como la velocidad de inyección influye en la viscosidad del gel que se formara *in situ*.

Al someter el gel a cambios de temperatura de 25 a 45°C se observa que la viscosidad varía ligeramente al aumentar este parámetro por lo que se puede decir que se mantiene estable (Fig. 25).

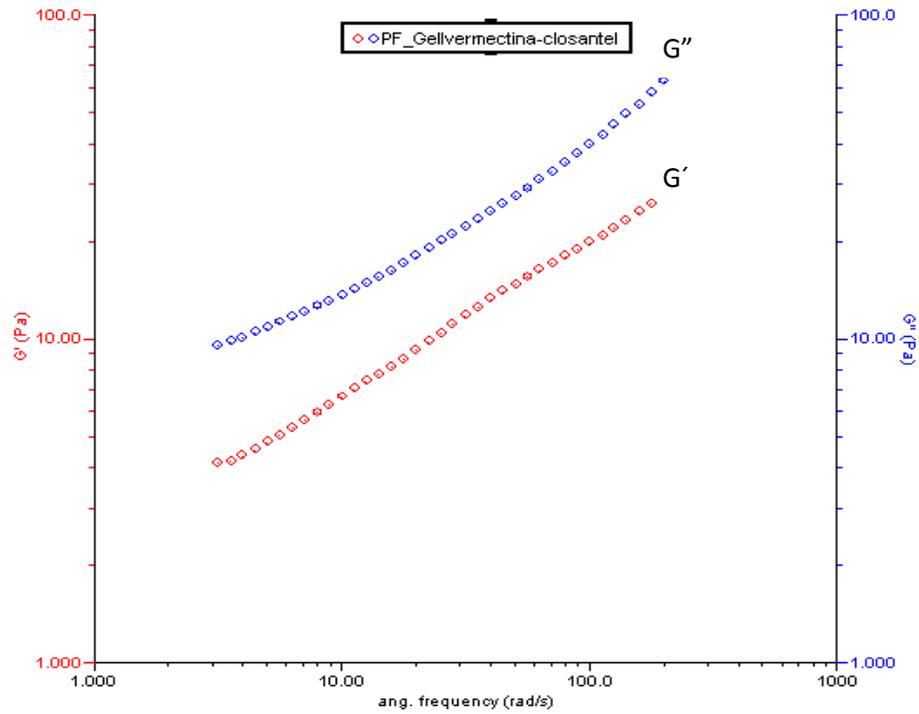


Figura 22. Evolución de los módulos G' y G'' exhibiendo un comportamiento de un fluido-viscoelástico ($G'' > G'$)

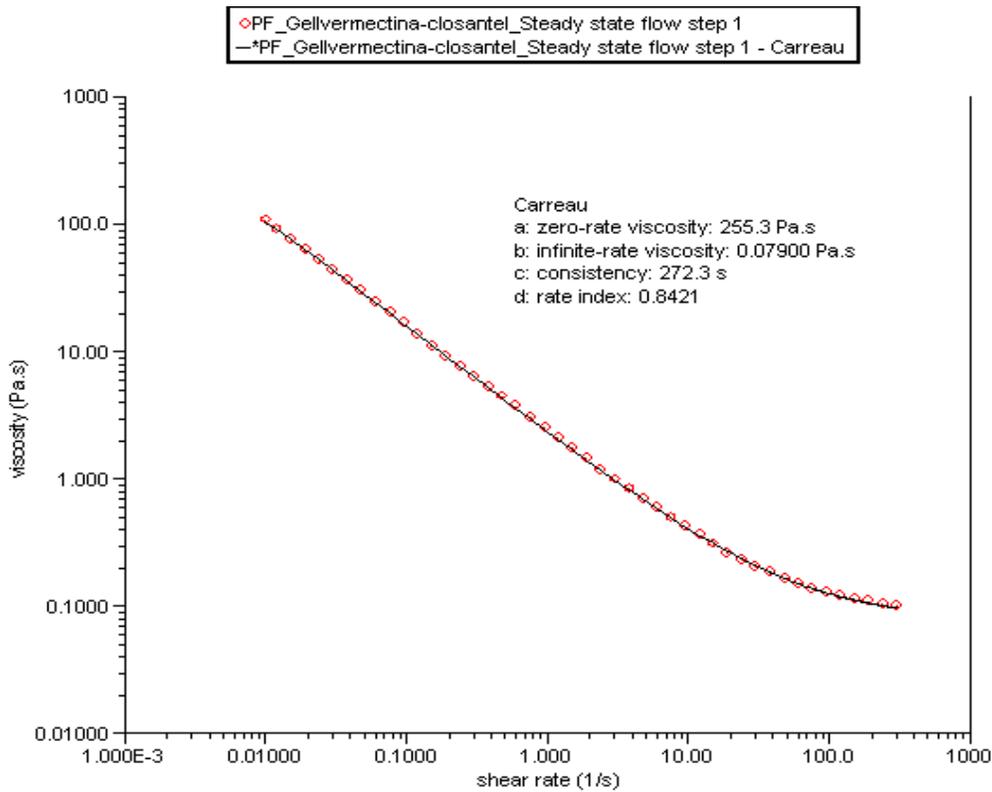


Figura 23. Curva de viscosidad en función de la velocidad de cizalla.

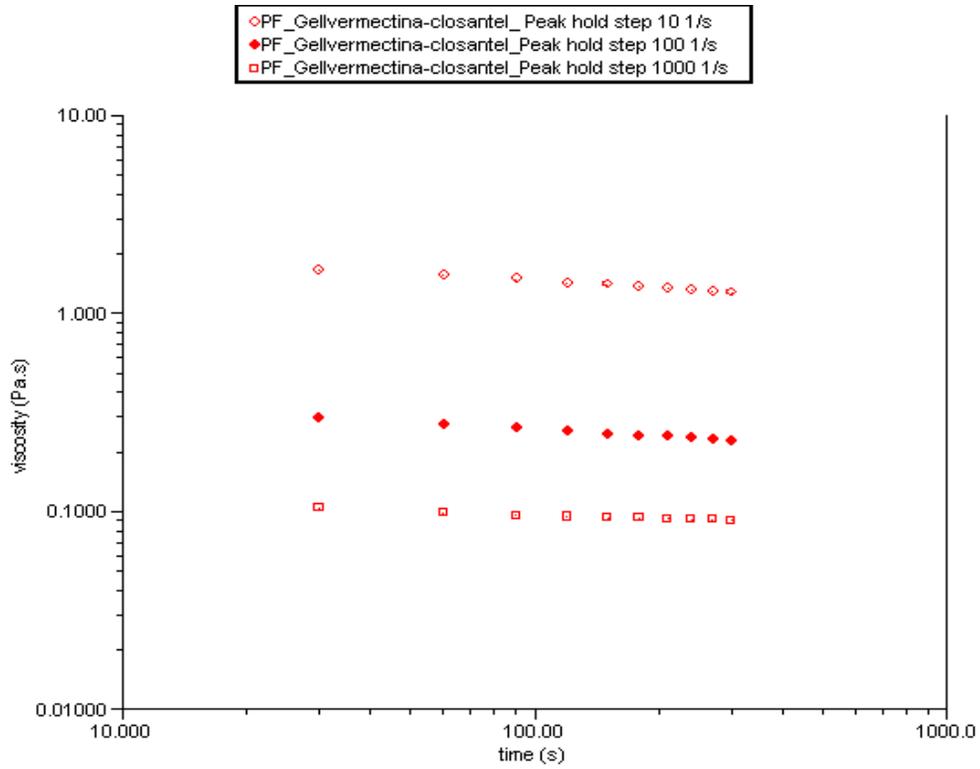


Figura 24. Evolución de viscosidad a diferentes condiciones de corte en función del tiempo

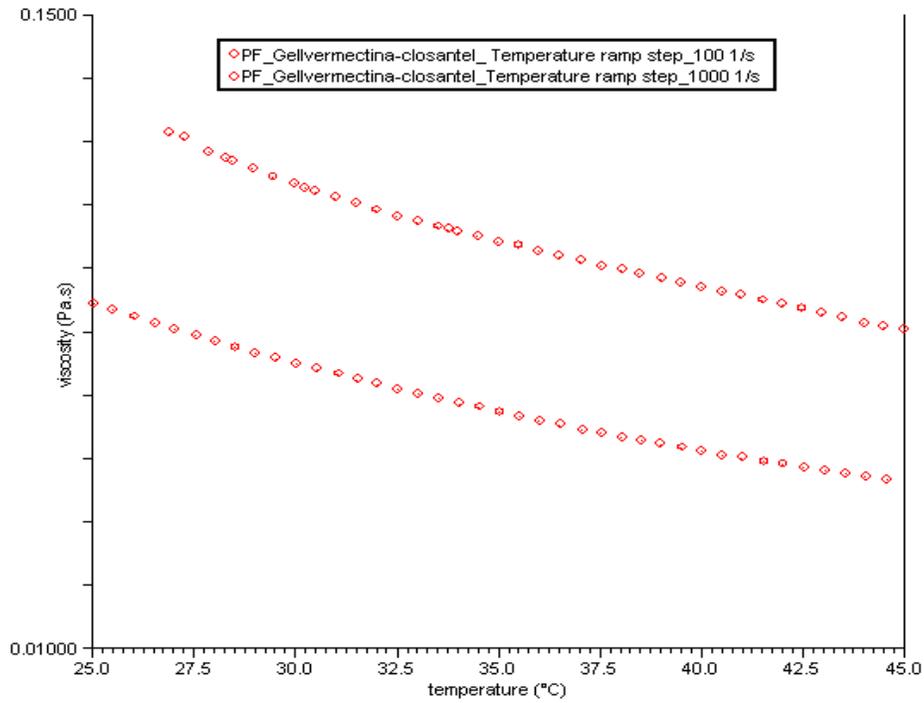


Figura 25. Estabilidad de viscosidad al aumento de temperatura

6.5 Estudios in vivo

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos al administrar los sistemas de liberación modificada :

Tabla 9. Características de la administración de los sistemas de liberación modificada

Preparado	Cargado	Inyectabi - lidad	Reacción inicial	Reacción a un día	Reacción a la semana	Observaciones
Gel	Fácil	Fácil sin dolor	Depósito	Inflamación moderada (10 veces deposito)	Disminuyó un 50%	Se hace una ligera separación de capas que desaparece al agitar.
Np PLA	Burbujas	Fácil sin dolor	Depósito	Inflamación moderada (8 veces deposito)	Disminuyó un 50%	Las burbujas impiden dosificar correctamente.
Np PLGA	Burbujas y precipitados	Fácil sin dolor	Depósito	Inflamación ligera*	No inflamación	Producto inestable
Control	Fácil	Fácil sin dolor	Depósito	Inflamación mínima	No inflamación	Sin observaciones

* El producto se precipito con puntos negros y blancos.

La información proporcionada por la tabla nos indica que el gel tuvo menos problemas al ser cargado y que los tres sistemas de liberación modificada se inyectaron sin dolor, pero provocaron inflamación que disminuyó a un 50% 7 días después de la administración.

Las burbujas presentadas por la solución de las Np son causadas por la presencia de los remanentes de los tensoactivos, por lo que un lavado más sería adecuado para facilitar el cargado.

La inestabilidad de sistema nanoparticulado de Np de PLGA (precipitación) se debe a su bajo potencial zeta. Los puntos negros que presentó esta formulación se observaron al microscopio óptico, y se identificaron como hongos, por consiguiente hubo una contaminación microbiológica, sugiriendo así su preparación en una campana de flujo laminar y se mantenga en refrigeración.

Las especies de vacas a la cual se les suministró el gel y las Np fueron *Bos indicus* (Cebú) y F1 (cruza de *Suiza-Cebuina*) (Fig. 26 y 27). Los animales cebuinos presentaron un mayor grado de inflamación que los F1, debido al grado de desarrollo de su sistema inmune.



Figura 26. Inflamación casuada por la administración de NP de PLA.



Figura 27. Inflamación en vaca Cebú al administrar el gel de formación *in situ*.

La disminución de la inflamación se asocia posiblemente a la difusión del etanol, dejando solamente el depósito.

El diagnóstico de las infecciones parasitarias se hizo mediante el análisis de microscópico de muestras fecales, mediante técnicas de concentración

(sedimentación y flotación). Los resultados se presentan en la tabla siguiente (Tabla 10):

Tabla 10. Efectividad clínica de los diferentes sistemas de liberación modificada (Np de PLGA y PLA , Gel)

Grupo/animal	Previo dosificación (g de heces)		7 días pos dosificación (g de heces)		15 días pos-dosificación (g de heces)	
	Flotación	Sedimentación	Flotación	Sedimentación	Flotación	Sedimentación
Gel/235	500	550	0	0	0	0
Gel/542	650	500	0	0	0	0
Gel/342	750	500	0	0	0	0
Gel/284	650	500	0	0	0	0
Gel/105	800	550	0	0	0	0
Gel/234	500	550	0	0	0	0
Gel/225	50	500	0	0	0	0
Gel/547	550	500	0	0	0	0
Gel/025	500	650	0	0	0	0
Gel/547	500	500	0	0	0	0
Gel/425	750	650	0	0	0	0
Gel/302	700	750	0	0	0	0
Gel/574	750	500	0	0	0	0
Gel/312	650	500	0	0	0	0
Gel/362	600	550	0	0	0	0
Gel/054	650	750	0	0	0	0
Gel/068	500	500	0	0	0	0
Gel/086	550	500	0	0	0	0

Gel/562	500	550	0	0	0	0
Gel/359	550	650	0	0	0	0
Sus/425	500	750	0	0	0	0
Sus/483	550	750	0	0	0	0
Sus/487	600	500	0	0	0	0
Sus/465	650	500	0	0	0	0
Sus/481	650	550	0	0	0	0
Sus/405	550	750	0	0	0	0
Sus/452	50	500	0	0	0	0
Sus/356	550	750	0	0	0	0
Susp/058	500	500	50	100	50	200
Susp/036	500	750	100	100	150	500
Susp/138	650	650	100	300	300	150
Susp/087	500	500	150	100	200	50

Gel=producto ivermectina +closantel; Sus: suspensión PLA Susp= suspensión precipitada+hongos PLGA

En la tabla 8 observamos que los bovinos estaban infectados de huevos y larvas de nematodos, huevos de ácaros y ooquistes detectados por la flotación y de huevos pesados de trématodos como *Fasciola hepática* y *Paramphistomidos* obtenidos por sedimentación.

A los siete días de administración, se observa que a una dosis de 250 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de ivermectina y 2.5 mg/Kg de closantel la cuantificación se reduce a cero para el caso de las NP de PLA y para el Gel (ivermectina+ closantel) manteniéndose así por quince días, sin embargo para el caso de NP de PLGA la dosis en que se encuentra presente la ivermectina no fue la suficiente para producir una efectividad del 100%, posiblemente debido a la precipitación observada la dosis no se administró correctamente. Esto se ve reflejado desde la primera semana, cuando la efectividad clínica fue de aproximadamente 80% y un 60% para la

segunda (tomando como 100% de efectividad la ausencia de parásitos), lo cual provocó una subdosificación que puede generar la aparición de resistencias por presión de selección.

Por otra parte el tiempo de efectividad clínica se sigue muestreando hasta completar el esquema establecido que es de 1, 15 días y 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 meses y así poder concluir el tiempo de duración de estos sistemas de liberación modificada.

VII.- Conclusiones

Se obtuvieron nanopartículas de PLGA e ivermectina por el método de emulsión difusión, con un potencial zeta bajo pero con un tamaño y reproducibilidad viables para su administración.

La técnica analítica que determinó la presencia del polímero, aceite de ricino e ivermectina fue $^1\text{H-RMN}$.

La reología de semisólido elaborado indica que el gel obtenido tiene un comportamiento viscoelástico, cuya viscosidad se ve afectada por la velocidad de corte.

Los sistemas elaborados se administraron subcutáneamente presentando inflamación en los animales.

Se determinó la efectividad clínica del gel y de las nanopartículas por técnicas de flotación y sedimentación, mostrando un 100% eficacia en el gel, NP de PLA y un 80% para NP de PLGA.

VIII.-Referencias

1. McKellar, Q.A. and F. Jackson, *Veterinary anthelmintics: old and new*. TRENDS in Parasitology, 2004. **20**(10): p. 456-461.
2. Borgsteede, F.H.M., et al., *The efficacy of an ivermectin/closantel injection against experimentally induced infections and field infections with gastrointestinal nematodes and liver fluke in cattle*. Veterinary Parasitology, 2008. **155**(3-4): p. 235-241.
3. Agrovetmarket. *Closantel plus, México, 25 Febrero*. 2010 [cited.
4. Rodríguez-Vivas, R., et al., *Manual Técnico para el control de garrapatas en el ganado Bovino 2006*, Publicación Técnica No. 4: Jiutepec., Morelos, México. p. 36.
5. InfoMerial. *Las Garrapatas, México, 19 Noviembre, 2009*. 2009 [cited.
6. Estrada-Peña, A., Z. García, and H.F. Sánchez, *The distribution and ecological preferences of Boophilus microplus (Acari: Ixodidae) in Mexico*. Experimental and Applied Acarology, 2006. **38**(4): p. 307-316.
7. Cutullé, C., N.N. Jonsson, and J.M. Seddon, *Multiple paternity in Rhipicephalus (Boophilus) microplus confirmed by microsatellite analysis*. Experimental and Applied Acarology, 2009: p. 1-8.
8. García Tapia , D., et al., *BABESIOSIS BOVINA: Características relevantes de la respuesta inmune*. CIENCIA VETERINARIA 2003. **9**(4): p. 105-119.
9. Lifschitz, A., et al., *Pharmacokinetic evaluation of four ivermectin generic formulations in calves*. Veterinary Parasitology, 2004. **119**(2-3): p. 247-257.
10. Davey, R.B., et al., *Therapeutic and persistent efficacy of a long-acting (LA) formulation of ivermectin against Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) and sera concentration through time in treated cattle*. Veterinary Parasitology, 2009.
11. Pereira, J.R., *The efficiency of avermectins (abamectin, doramectin and ivermectin) in the control of Boophilus microplus, in artificially infested bovines kept in field conditions*. Veterinary Parasitology, 2009. **162**(1-2): p. 116-119.
12. Assen L. Dourmishev, L.A.D., and Robert A. Schwartz, *Ivermectin: pharmacology and application in dermatology*. International Journal of Dermatology, 2005. **44**(2005): p. 981-988.
13. García Gonzalez, L., *Formulación inteligente de ivermectina para el control de la garrapata evitando efectos adversos en el equilibrio ecológico*, in *Farmacia 2008*, UNAM: México D.F. p. 10-27.
14. García Salas, C., *Obtencion de nanoparticulas de poliE-caprolactona (PCL) e Ivermectina modificadas con polietilenglicol (PEG) 6000 y su evaluacion en el proceso de fagocitosis in Farmacia 2007*, UNAM México
15. Geary, T.G., *Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug*. TRENDS in Parasitology, 2005. **21**(11): p. 530-532.
16. Dourmishev, A.L., L.A. Dourmishev, and R.A. Schwartz, *Ivermectin: Pharmacology and application in dermatology*. International Journal of Dermatology, 2005. **44**(12): p. 981-988.
17. González Canga, A., et al., *The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species*. Veterinary Journal, 2009. **179**(1): p. 25-37.
18. Guerrero, J., *Closantel: A review of its antiparasitic activity*. Preventive Veterinary Medicine, 1984. **2**(1-4): p. 317-327.

19. Sun, H., F. Wang, and L. Ai, *Validated method for determination of ultra-trace closantel residues in bovine tissues and milk by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2007. **1175**(2): p. 227-233.
20. Hanna, R.E.B., et al., *The effect of a parenteral ivermectin/closantel injection on the growth and reproductive development of early immature Fasciola hepatica in cattle*. Veterinary Parasitology, 2006. **142**(1-2): p. 78-90.
21. Borges, F.A., et al., *Endectocide activity of a new long-action formulation containing 2.25% ivermectin + 1.25% abamectin in cattle*. Veterinary Parasitology, 2008. **155**(3-4): p. 299-307.
22. Maeda, H., M. Brandon, and A. Sano, *Design of controlled-release formulation for ivermectin using silicone*. International Journal of Pharmaceutics, 2003. **261**(1-2): p. 9-19.
23. Alvinerie, M., et al., *Persistence of ivermectin in plasma and faeces following administration of a sustained-release bolus to cattle*. Research in Veterinary Science, 1999. **66**(1): p. 57-617yf.
24. Rehbein, S. and M. Visser, *Efficacy of ivermectin delivered via a controlled-release capsule against small lungworms (Protostrongylidae) in sheep*. Journal of Veterinary Medicine, Series B, 2002. **49**(7): p. 313-316.
25. Patentes, O.E.d. *Composiciones inyectables que contienen 25-ciclohexil-ivermectina B1*. 2009 [cited].
26. Guinebretiére, S., et al., *Nanocapsules of biodegradable polymers: Preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy*. Materials Science and Engineering C, 2002. **21**(1-2): p. 137-142.
27. Bernad Bernad, M.J., D. Quintanar Guerrero, and M.C. L., *Sistemas de liberación controlada de activos farmacéuticos*. Asociación Farmacéutica Mexicana A. C., 2003.
28. Chien, Y.W. and S. Lin., *Drug Delivery: Controlle Release.*, in *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. 2005, LinkNew York: New York. p. 1082-1102.
29. Ranade V., V. and M. Holliger A., eds. *Drug Delivery systems*. second edition ed. Pharmacology and toxicology 2002: Washington, D.C. 309-311, 337-347, 369.
30. Ofner, C.M. and C.M. Klech-Gelotte, *Gels and Jellies*. 3 ed. Encyclopedia of pharmaceutical technology Vol. 3. 2005, New York: Link New York. 1875-1889.
31. Kumar, S., B.O. Haglund, and K.J. Himmelstein, *In situ-forming gels for ophthalmic drug delivery*. Journal of Ocular Pharmacology, 1994. **10**(1): p. 47-56.
32. Himmelstein, K.J. and B.O. Haglund, *An in situ gelling delivery system for parenteral injection*. Proceedings of the Controlled Release Society, 1994(21): p. 519-520.
33. Madan, M., et al., *In situ forming polymeric drug delivery systems*. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. **71**(3): p. 242-251.
34. Koo, H., et al., *A new biodegradable crosslinked polyethylene oxide sulfide (PEOS) hydrogel for controlled drug release*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **374**(1-2): p. 58-65.
35. Hudson, S.P., et al., *Injectable in situ cross-linking hydrogels for local antifungal therapy*. Biomaterials. **31**(6): p. 1444-1452.
36. Bekturov, E.A. and L.A. Bimendina, *Interpolymer complexes* Advances in Polymer Science, 1981(41): p. 99-147.
37. Oyama, H.T., W.T. Tang, and C.W. Frank, *Effect of the hydrophobic interaction in the poly(methacrylic acid)/pyrene end-labeled poly(ethylene glycol) complex*. Macromolecules, 1987. **20**(8): p. 1839-1847.

38. Nekrasova, T.N., et al., *Potentiometric titration of polyacrylic acid, polymethacrylic acid and poly-L-glutamic acid*. Polymer Science U.S.S.R., 1965. **7**(5): p. 1008-1018.
39. Chawla, J.S. and M.M. Amiji, *Biodegradable poly(μ -caprolactone) nanoparticles for tumor-targeted delivery of tamoxifen*. International Journal of Pharmaceutics, 2002. **249**(1-2): p. 127-138.
40. Hans, M.L. and A.M. Lowman, *Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting*. Current Opinion in Solid State and Materials Science, 2006. **0**: p. 319-327.
41. James, S., *Encyclopedia of pharmaceutical technology* 2005, LinkNew York: New York. p. 1082-1102, 1183-1184.
42. Hassou, M., *Modelisation et simulation de la Formation des Nanocapsules polymeriques par la methode d' emulsion-diffusion*. 2008.
43. Chavez, F., *Liberación de sustancias lipófilicas a partir de nanocápsulas poliméricas*, in *Sociedad Química de México* 2002.
44. Gallardo, M., et al., *Study of the mechanisms of formation of nanoparticles and nanocapsules of polyisobutyl-2-cyanoacrylate*. International Journal of Pharmaceutics, 1993. **100**(1-3): p. 55-64.
45. Landfester, K., *The Generation of Nanoparticles in Miniemulsions*. 2001, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
46. Espinosa García, N., *Emulsion/microemulsión: sistema ternario agua-aceite mineral-Hexaoleato de sorbitol etoxilado 40*, in *Fisicoquímica* 2009, UNAM México p. 40-42.
47. Quintanar-Guerrero, D., et al., *Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique*. Pharmaceutical Research, 1998. **15**(7): p. 1056-1062.
48. Quintanar-Guerrero, D., et al., *Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. **143**(2): p. 133-141.
49. Mosqueira, V.C.F., et al., *Poly(D,L-Lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2000. **89**(5): p. 614-626.
50. Guinebretière, S., et al., *Nanocapsules of biodegradable polymers: Preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy*. Materials Science and Engineering C, 2002. **21**(1-2): p. 137-142.
51. Guinebretière, S., et al., *Study of the emulsion-diffusion of solvent: Preparation and characterization of nanocapsules*. Drug Development Research, 2002. **57**(1): p. 18-33.
52. Colombo, A.P., et al., *Project, design, and use of a pilot plant for nanocapsule production*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2001. **27**(10): p. 1063-1072.
53. Chernysheva, Y.V., et al., *Effect of the type of hydrophobic polymers on the size of nanoparticles obtained by emulsification-solvent evaporation*. Mendeleev Communications, 2003. **13**(2): p. 65-68.
54. Kwon, H.Y., et al., *Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2001. **182**(1-3): p. 123-130.
55. Astete, C.E. and C.M. Sabliov, *Synthesis and characterization of PLGA nanoparticles*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2006. **17**(3): p. 247-289.
56. Inc., Z.M. *Potencial Zeta: Un curso completo en cinco minutos* 1997 [cited 20 Noviembre].
57. Fonseca, C., S. Simões, and R. Gaspar, *Paclitaxel-loaded PLGA nanoparticles: Preparation, physicochemical characterization and in vitro anti-tumoral activity*. Journal of Controlled Release, 2002. **83**(2): p. 273-286.

58. Nehilla, B.J., et al., *Purified and surfactant-free coenzyme Q10-loaded biodegradable nanoparticles*. International Journal of Pharmaceutics, 2008. **348**(1-2): p. 107-114.
59. Baimark, Y., et al., *Preparation of surfactant-free nanoparticles of methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly(D,L-lactide-co-glycolide-co-e-caprolactone)*. Colloid Journal, 2009. **71**(1): p. 18-21.
60. Zhang, Z. and S.S. Feng, *In vitro investigation on poly(lactide)-tween 80 copolymer nanoparticles fabricated by dialysis method for chemotherapy*. Biomacromolecules, 2006. **7**(4): p. 1139-1146.
61. Loo, J.S.C., C.P. Ooi, and F.Y.C. Boey, *Degradation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and poly(L-lactide) (PLLA) by electron beam radiation*. Biomaterials, 2005. **26**(12): p. 1359-1367.