



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Desarrollo de una nanosuspensión de un derivado de carbamatos
(LQM 919) para el tratamiento de garrapatas en vacas**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN FARMACIA

P R E S E N T A:

JAZMIN PAOLA HERRERA LÓPEZ

ASESOR: DR. ROBERTO DIAZ TORRES

COASESOR: DR. ENRIQUE R. ÁNGELES ANGUIANO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, NOVIEMBRE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: LA. LAURA MARGARITA CONTRAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Desarrollo de una nanosuspensión de un derivado de carbamatos (LQM 919) para el tratamiento de garrapatas en vacas.

Quo presenta la posante: Jazmín Paola Herrera López

Con número de cuenta: 411132851 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Farmacia.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestra VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcailli, Méx. a 15 de Agosto de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>D.A.R. Juan José Díaz Escquivel</u>	
VOCAL	<u>Dra. Flora Adriana Guzmán Rondero</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Roberto Díaz Torres</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Dr. José Juan Escobar Chávez</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M en C. Gabriela Rodríguez Patiño</u>	

NOTA: A los miembros el Jurado se les otorga el derecho a presentarse el día y hora del Examen Profesional (Art. 127)

LMCT/ign

Agradecimientos

- ♥ A la Universidad Autónoma de México y especialmente a la Facultad de Estudios Superior de Cuautitlán por brindarme los conocimientos necesarios para obtener un trabajo digno y satisfactorio, y permitirme ser parte de su historia.
- ♥ A mi asesor el Dr. Roberto Díaz Torres por sus siempre sinceras palabras de apoyo, su confianza, alegría y comprensión. Y por creer en mí.
- ♥ A los miembros del jurado, que todos fueron mis maestros en algún momento de la carrera, muchas gracias por su apoyo, paciencia, comprensión y sus aportaciones para que este trabajo finalizara.
- ♥ A la Dra. Sandra Lizeth Iturbe Requena por su colaboración en este trabajo, gracias por su apoyo.
- ♥ A mis compañeros en el laboratorio 9, que se convirtieron en mis amigos, sus consejos tanto personales como académicos siempre los llevaré conmigo.
- ♥ A mis maestros de la carrera, sin ellos no estaría en este lugar gracias por sus enseñanzas y aprendizajes que sembraron en mí.

Dedicatoria

- ♥ Gracias a Dios por permitirme estar en este lugar y en este tiempo para realizar este trabajo, por darme la fortaleza de concluir mis estudios.
- ♥ A mi Madre por darme todo su amor y paciencia. Gracias a ella he logrado todo en mi vida.
- ♥ A mis hermanos Samuel y Javier que me han acompañado toda la vida y sé que puedo contar con ellos cuando los necesite.
- ♥ A toda mi familia que ha apoyado a mi madre y a mí por el transcurso de este camino llamado vida.
- ♥ A mis amigas de toda la vida: Lupita, Kellin, Valeria, Diana y Karlita con las que he compartido muchas cosas y espero compartir muchas más.
- ♥ A Hazael Parra por acompañarme en la vida, teniendo ese amor incondicional hacia mí.
- ♥ A mis amiguitos de la Universidad: Alex Juan y Omar los amordoro siempre me apoyaron y fueron los mejores conmigo.
- ♥ A mis amigos y compañeros de la Universidad que me acompañaron durante todo el trayecto universitario, siempre los llevare en mi corazón.

CONTENIDO	PAG.
ÍNDICE DE TABLAS	2
ÍNDICE DE GRÁFICAS	4
ÍNDICE DE DIAGRAMAS DE PARETO	5
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ABREVIATURAS	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. MARCO TEÓRICO	12
III. JUSTIFICACIÓN	42
IV. OBJETIVOS	44
V. HIPÓTESIS	46
VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL	48
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
VIII. CONCLUSIONES	90
IX. PERSPECTIVAS	92
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

ÍNDICE DE TABLAS	PAG.
Tabla 1. Principales agentes infecciosos y enfermedades del bovino transmitidas por garrapatas en México.	17
Tabla 2. Ixodicidas y lactonas macrocíclicas en México para el control de garrapatas en el ganado bovino.	23
Tabla 3. Agentes suspensores.	31
Tabla 4. Tipos de conservadores	32
Tabla 5. Resultados de IC95 (mg/mL) obtenidos del LQM-919	39
Tabla 6. Equipos e instrumentos.	49
Tabla 7. Excipientes para la fabricación de una suspensión farmacéutica.	20
Tabla 8. Diseño de experimentos para formulaciones con HPMC.	55
Tabla 9. Diseño de experimentos para formulaciones con Alginato.	55
Tabla 10. Diseño de experimentos para formulaciones con Quitosán.	57
Tabla 11. Segundo Diseño de experimentos para formulaciones con Quitosán.	57
Tabla 12. Características del LQM 919.	64
Tabla 13. Concentración del viscosante utilizado en la nanosuspensión.	65
Tabla 14. Prueba de incompatibilidades entre excipiente y principio activo	66
Tabla 15. Resultados sobre el tamaño de partícula de las formulaciones con HPMC como polímero	67
Tabla 16. Optimización de la Respuesta para diseño de experimentos de HPMC	69

Tabla 17. Resultados sobre el tamaño de partícula de las formulaciones con Alginato como viscosante	70
Tabla 18. Optimización de respuesta para diseño de experimentos de Alginato	72
Tabla 19. Datos obtenidos de la prueba <i>in vitro</i> de inmersión de hembras repletas	74
Tabla 20. Resultados de las pruebas de inmersión de hembras repletas.	75
Tabla 21. Prueba de Quitosán a diferentes pH's y tensoactivos	76
Tabla 22. Resultados del diseño de experimentos de Quitosán con diferentes tensoactivos.	77
Tabla 23. Ponderación a tamaño y cantidad de agujas.	77
Tabla 24. Resultados de tamaño de partícula de las formulaciones con Quitosan y PVA a diferentes concentraciones	83
Tabla 25. Optimización de las variables de Quitosán	84
Tabla 26. Formulación final de la nanosuspensión con Quitosán	85
Tabla 27. Estabilidad de la formulación final de la nanosuspensión con Quitosán.	89

ÍNDICE DE GRÁFICAS	PAG.
Gráfica 1. Efectos principales para la variable tamaño de partícula con HPMC.	69
Gráfica 2. Efectos principales para la variable tamaño de partícula con Alginato.	72
Gráfica 3. Efectos principales para la variable tamaño de partícula con Quitosán.	79
Gráfica 4. Efectos principales para tamaño de agujas con Quitosán	80
Gráfica 5. Efectos principales para la variable cantidad de agujas con Quitosán	82
Gráfica 6. Optimización de múltiples respuestas para diseño de experimentos de Quitosán	84

ÍNDICE DIAGRAMA DE PARETO	PAG
Diagrama de Pareto estandarizado 1. Respuesta tamaño de partícula con HPMC	68
Diagrama de Pareto estandarizado 2. Respuesta tamaño de partícula con Alginato	71
Diagrama de Pareto estandarizado 3. Respuesta tamaño de partícula con Quitosán	78
Diagrama de Pareto estandarizado 4. Respuesta tamaño de agujas con Quitosán	80
Diagrama de Pareto estandarizado 5. Respuesta cantidad de agujas con Quitosán	81

ÍNDICE DE FIGURAS	PAG
Figura 1. <i>R. microplus</i> .	14
Figura 2. Ciclo biológico de <i>R. microplus</i> . Los estadíos de la garrapata que ocurren sobre el hospedero son la fase parásita, y los que ocurren en el suelo pertenecen a la fase no parásita.	15
Figura 3. Territorio Nacional donde se muestran las zonas de control, erradicación y libre de garrapata <i>Boophilus spp.</i>	19
Figura 4. Representación esquemática del control integrado de garrapatas (<i>Rhipicephalus microplus</i>) propuesto para la ganadera bovina de la península de Yucatán, México. La línea continua representa los niveles de infestación de bovinos con garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> reportado en el estado de Yucatán.	22
Figura 5. Estructura general del grupo carbamato.	36
Figura 6. Estructura de Carbaril utilizado como insecticida.	37
Figura 7. Clasificación de los carbamatos.	38
Figura 8. Estructura de LQM 919.	39
Figura 9. Unión del carbamato a la acetilcolinesterasa, carbamilación.	40
Figura 10. Metodología.	
Figura 11. Recolección de garrapatas.	58
Figura 12. Distribución de garrapatas en lotes.	59
Figura 13. Garrapatas preparadas para incubación.	59
Figura 14. Garrapatas <i>R. microplus</i> después de la prueba de inmersión	

de hembras repletas.	74
Figura 15. Formulación final de la nanosuspensión con Quitosán.	86
Figura 16. Garrapatas después de técnica de inmersión de hembras repletas con formulación de Quitosán.	87

ABREVIATURAS

CMC Carboximetilcelulosa

CS Quitosán

FESC: Facultad De Estudios Superiores Cuautitlán

FEUM: Farmacopea De Los Estados Unidos Mexicanos

HPMC: Hidroxipropilmetilcelulosa

LQM 919: etil-(4-bromofenil) carbamato

mg: Miligramos

min: Minuto

NOM: Norma Oficial Mexicana

p. a: Principio activo

PAG: Página

pH: Potencial de Hidrógeno

Pluronic: Pluronic F-68

PVA Polivinilalcohol

Rhipicephalus microplus: *R. microplus*

SAGARPA: Secretaria De Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación

SENASICA: Servicio Nacional De Sanidad, Inocuidad Y Calidad Agroalimentaria

%Op: Porcentaje de oviposición

%InhOp: Porcentaje de inhibición de la oviposición

%Ec: Porcentaje de eclosión

I

INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica veterinaria se encarga de fabricar medicamentos de alta calidad para el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades en animales y así mejorar su calidad de vida, sin embargo en muchas ocasiones a este sector no se le da la importancia que merece.

El desarrollo de productos nuevos, eficientes, económicos, innovadores y que no dañen al medio ambiente cada vez es más necesario en esta área, siendo la nanotecnología una nueva opción en el desarrollo de medicamentos pues ya se conocen aplicaciones terapéuticas y diagnósticas. Esta tecnología busca producir menos efectos secundarios al emplear concentraciones mínimas y que actúan de manera eficiente en el sitio blanco.

En este trabajo se realizó el desarrollo de una nanosuspensión con propiedades ixodicidas contra la garrapata *R. microplus*, teniendo una nueva alternativa contra la infestación de este parásito en el ganado bovino. Los fármacos utilizados por lo general son organofosforados, los cuales son tóxicos y dañan el medio ambiente además de que han provocado resistencia en garrapatas por lo que es más difícil eliminarlas.

El LQM 919 (etil-(4-bromofenil) carbamato) es una nueva molécula desarrollada en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán que ya ha sido estudiada y se ha determinado su eficacia contra este ectoparasito, la cual resulta ser una opción más ecológica e innovadora para los ganaderos.

La infestación de garrapatas *R. microplus* en el ganado vacuno y las consecuencias que esta acarrea, pérdida en el peso del animal, baja producción de carne y leche y transmisión de enfermedades son la causa por la que el desarrollo de nuevas alternativas es de suma importancia, ya que trae consigo un decremento en las ganancias de los ganaderos.

II

MARCO

TEÓRICO

- **Garrapatas**

Las Garrapatas son ácaros artrópodos, ectoparásitos hematófagos comunes en climas tropicales y subtropicales, comprendidas en dos familias: *Ixodidae* (garrapatas duras) y *Argasidae* (garrapatas blandas).

- a) Familia *Ixodidae*: Son la mayor familia de garrapatas: los géneros más importantes son: *Dermacentor*, *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Boophilus* y *Amblyomma*. Tienen solo tres estadios postembrionales (larva, ninfa y adulto), necesitando cada uno alimentarse de un hospedero diferente.
- b) Familia *Argasidae*: Son ectoparásitos que se encuentran en serpientes, lagartos, tortugas, aves, y algunos mamíferos. Existen 85 especies, algunas de las cuales tienen importancia médica y económica. Son garrapatas que se alimentan periódicamente de los mismos hospedadores; se les suele encontrar en nidos, refugios o madrigueras de pájaros o pequeños mamíferos especialmente murciélagos (Ávila, S. B. 2014).

Debido a su gran capacidad de adaptación y propagación las garrapatas del género *Rhipicephalus* se extienden en diversas áreas geográficas de todo el mundo. De las cinco especies que integran a nivel mundial el género *Rhipicephalus*, *R. microplus* presenta mayor importancia por su amplia distribución en gran parte de América (Rodríguez-Vivas et al. 2014).

- ***R. microplus***

Las garrapatas *R. microplus* (figura 1) también conocidas como *Boophilus microplus* son consideradas la especie más relevante a nivel mundial al tener como huéspedes al ganado bovino, ovejas, cerdos y perros de las praderas.



Figura 1. *R. microplus* (Prado-Ochoa MG 2013).

Su cuerpo o idiosoma es de forma ovalada, presenta un escudo en forma de lengüeta color café, el cual es corto en hembras y largo en machos, el gnasoma se sitúa en la región anterior del cuerpo. El gnatosoma comprende partes bucales de la garrapata. Está formado por un par de palpos con cuatro segmentos, un par de quilaceros esclerotizados y bisegmentados, y el hipostosoma en la parte media del gnatosoma. La base del gnatosoma es de forma hexagonal (Prado-Ochoa MG 2013).

- **Ciclo biológico**

Las garrapatas como ya se mencionó tienen tres etapas: larva, ninfa y adulta, (figura 2) y solo tiene un huésped en donde pasa los estadios de vida. Los huevos están en el medio ambiente, se pueden encontrar debajo de la tierra, hierba, piedras o grietas en el suelo.

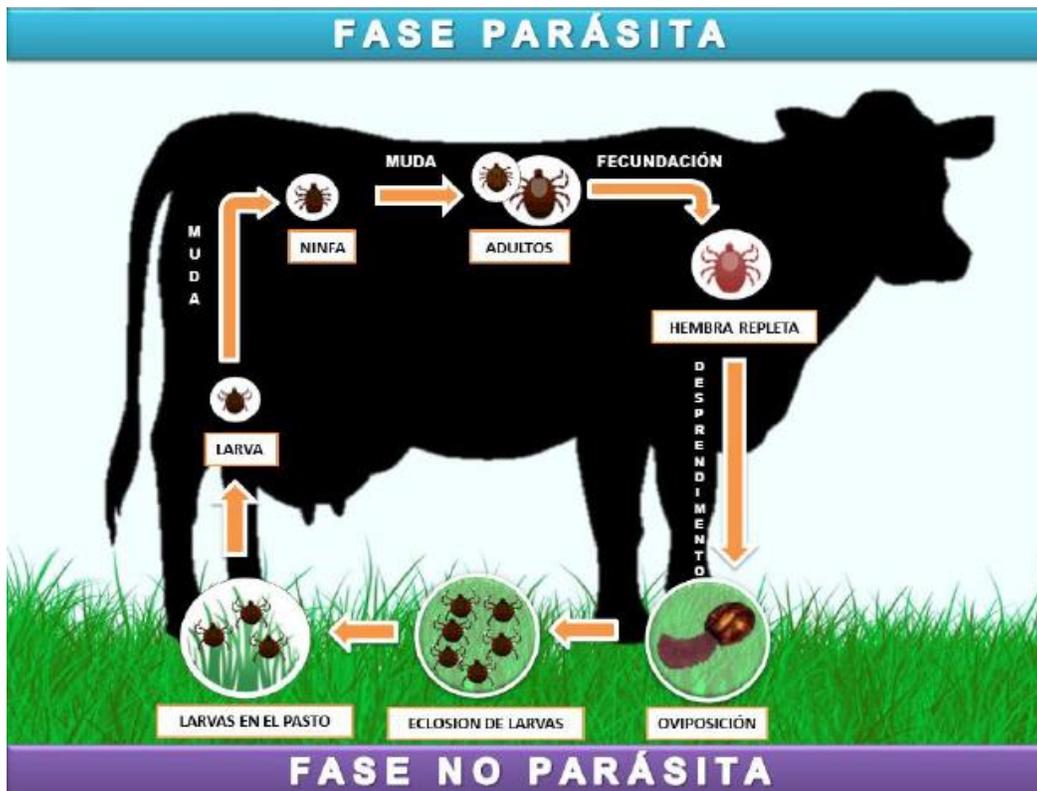


Figura 2. Ciclo biológico de *R. microplus*. Los estadios de la garrapata que ocurren sobre el hospedero son la fase parásita, y los que ocurren en el suelo pertenecen a la fase no parásita (Iturbide R. S. 2014).

Las larvas que emergen del huevo tienen seis patas y buscan a los huéspedes. Enseguida estas garrapatas suben a un huésped que roza sus patas delanteras expandidas. Después que se alimentan de sangre de un huésped vertebrado, mudan a la fase de ninfa y adquieren ocho patas. Las ninfas se alimentan y mudan

a la etapa siguiente y última: el adulto. Después de alimentarse una vez más, la hembra adulta con un tamaño aumentado se desprende y deposita miles de huevecillos en la tierra, muriendo después (Tapia, P., G. 2004).

- **Enfermedades producidas por garrapatas**

Las garrapatas pueden afectar gravemente el peso de los animales al disminuirlo considerablemente además de dañar su piel al alimentarse de ellos, también puede transmitir enfermedades en animales como la babesiosis y anaplasmosis y en humanos como la enfermedad de Lyme y la fiebre maculosa de las Montañas Rocosas.

Las infecciones transmitidas por garrapatas aparecen por todo el mundo y son bien conocidas desde hace más de 100 años. Algunas enfermedades transmitidas por garrapatas son muy comunes mientras que otras son extremadamente raras (Mutz, I. 2009). Algunos ejemplos se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Principales agentes infecciosos y enfermedades del bovino transmitidas por garrapatas en México. Fuente: Bayer HealthCare (s.f)

Agente infeccioso	Transmisor	Enfermedad
<i>Babesia bigemina</i>	<i>Boophilus spp.</i>	Fiebre de Texas o Piroplasmosis
<i>Babesia bovis</i>	<i>Boophilus spp., Ixodes spp.</i>	Hemoglobinuria epidémica
<i>Anoplasma marginale</i>	<i>Boophilus spp</i> <i>Amblyomma ssp.</i> <i>Rhipicephalus spp., Haemaphysalis spp.</i> <i>Ixodes spp.</i>	Anaplasmosis
<i>Anoplasma* centrale</i>	<i>Boophilus spp., Haemaphysalis spp.</i>	Anaplasmosis
<i>Ehrlichia bovis</i>	<i>Amblyomma ssp., Haemaphysalis spp.</i>	Rickettsiosis bovina
<i>Borrelia* theileri</i>	<i>Boophilus spp</i>	Espiroquetosis Bovina

*Posible presencia en el país.

La mayoría de las enfermedades en bovinos son transmitidas por especies del género *Boophilus spp.*, por esta razón es importante generar nuevos productos que se encarguen de combatir esta plaga.

R. microplus produce pérdidas relacionadas con mortalidad de los animales, reducción en los niveles de producción, alteraciones reproductivas, altos costos de control, transmisión de diversos agentes patógenos como virus, bacterias, rickettsias y protozoos. Esto puede conducir a enfermedades agudas, crónicas o incluso, a la muerte de los animales (Rodríguez-Vivas et al. 2014).

- **Situación actual del control de garrapatas**

En México, las garrapatas se encuentran distribuidas por todo el territorio mexicano, se encuentran en tres diferentes situaciones: control, erradicación y libre como se muestra en la Figura 3. El control se refiere a que las garrapatas están infectando al ganado, que aunque están presentes no representan un problema de salud aún. La erradicación se refiere a que en algún momento se encontraban garrapatas en esa parte del territorio, sin embargo fueron eliminadas y por último una zona libre significa que no hay presencia de garrapatas en el ganado bovino.

El 30 de marzo de 2015, El Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal (APHIS) del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) reconoció al Estado de Sonora como una región de México libre de garrapata *Boophilus spp.*

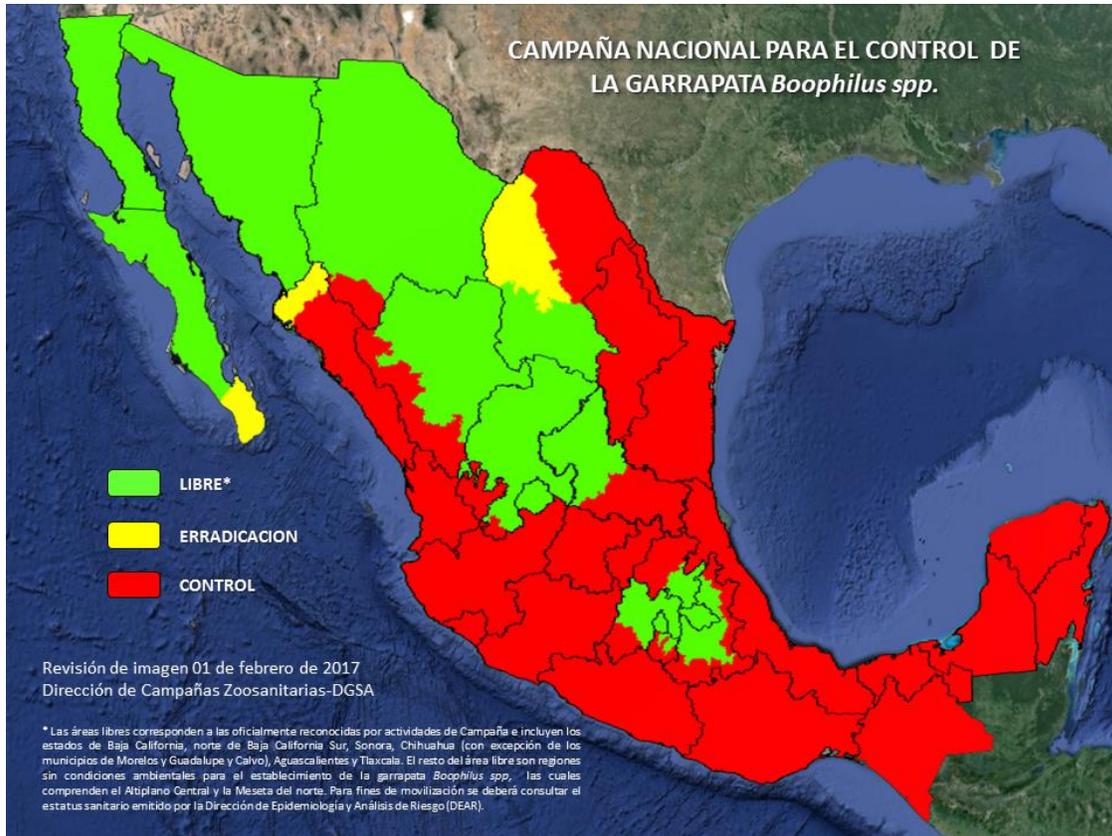


Figura 3. Territorio Nacional donde se muestran las zonas de control, erradicación y libre de garrapata *Boophilus spp* (SENASICA 2017).

Para ser más específicos la SENASICA en el 2017 tiene registrado que la superficie libre comprende 599,367.84 km², el 30.60% del territorio nacional. La superficie en erradicación abarca 67,472.76 km², el 3.44% del territorio nacional. La superficie en control comprende 1, 292, 407.02 km², el 65.96% del territorio nacional. Se reconoce a los Estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California y Chihuahua (con excepción de los municipios de Morelos y Guadalupe y Calvo) y el Norte de Baja California Sur como libres del ectoparásito.

En fase de erradicación se encuentran los Municipios de Los Cabos y la parte sur de La Paz en Baja California Sur; los municipios de Ahome, El Fuerte y Choix en el norte de Sinaloa, en su margen derecha del río El Fuerte; los municipios de la zona desierto del estado de Coahuila: Cuatrociénegas, Ocampo y Sierra Mojada. El resto del país comparte regiones en control y zonas libres naturales de garrapata *Boophilus spp.* (SENASICA 2017).

- **Control de las garrapatas**

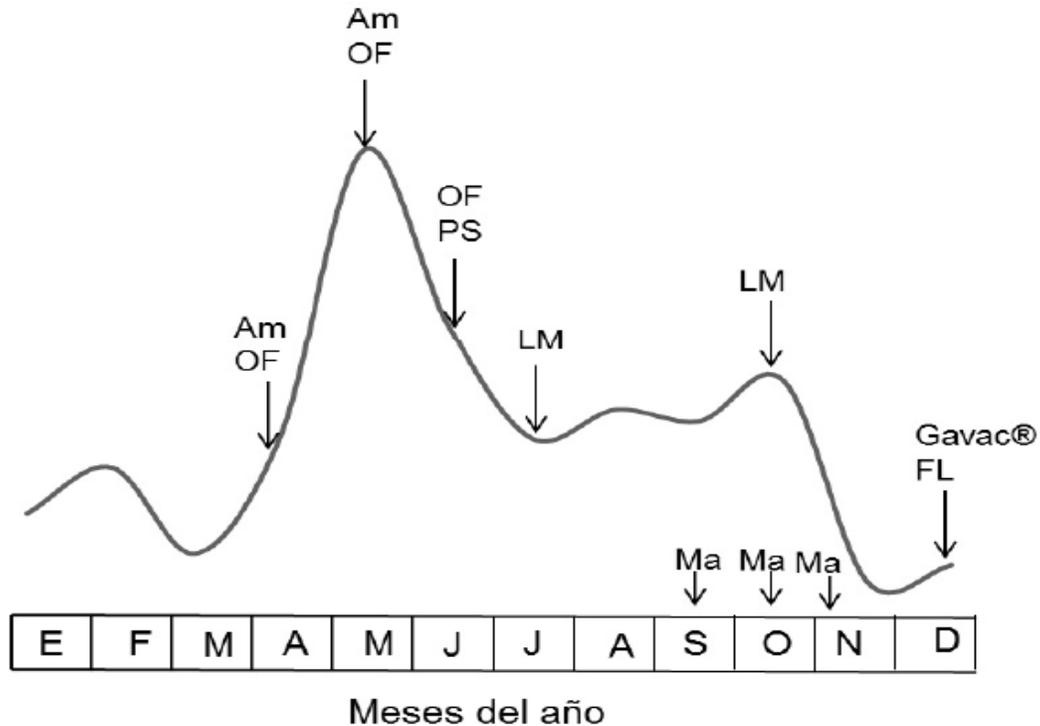
Existen dos tipos de control para las ixodidosis: el control químico y el control no químico. El control químico ha sido el más utilizado y se ha basado en el empleo de productos de diferentes familias químicas a lo largo de la historia. El control no químico conocido también como control biológico, se basa en aumentar la resistencia natural (Samish y Rehacek, 1999).

Actualmente el control de las garrapatas se lleva a cabo por medio de la rotación de ixodicidas, además de contar con vacunas y otro tipo de opciones como la quema y descanso de suelo.

Los ixodicidas son los productos químicos más utilizados para combatir garrapatas, los cuales han demostrado ser eficaces pero se necesita el desarrollo continuo para seguir con sus resultados.

Se define un ixodicida como un producto químico evaluado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural y autorizado por la CICOPLAFEST, que al ser usado en el ganado impide que la garrapata complete su ciclo biológico, pudiendo además causarle la muerte. También es denominado garrapaticida. (NOM-019-ZOO-1994)

Los métodos de control químico de las garrapatas, tienen como función romper los ciclos de vida de las garrapatas a través de la aplicación de ixodicidas a intervalos determinados por la región ecológica, especies a las que se va a combatir, eficacia residual o persistencia del antiparasitario. En México existen más de 50 productos para el control de garrapatas que incluyen seis grupos distintos con diferencias en sus mecanismos de acción (OF, PS, Am, fenilpirazolonas, reguladores del crecimiento y LM) y que se pueden aplicar por aspersion, inmersión, de forma epicutánea (pour-on) y por vía parenteral (inyectables), como se muestra en Figura 4. (Rodríguez-Vivas et al. 2014).



Am: Amitraz

OF: Organofosforado

PS: Piretroide sintético

Ma: *Metarhizium anisopliae*

LM: Lactona macrocíclica

Gavac: Vacuna antigarrapata

FL: Fluazurón

Figura 4. Representación esquemática del control integrado de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) propuesto para la ganadería bovina de la península de Yucatán, México. La línea continua representa los niveles de infestación de bovinos con garrapatas *Rhipicephalus microplus* reportado en el estado de Yucatán (Rodríguez-Vivas et al. 2006).

Los ixodicidas más empleados en México son: organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS) y amitraz (Am). Las lactonas macrocíclicas (LM) son endectocidas que también controlan las infestaciones por garrapatas y han sido usadas en los últimos años en México (Tabla 2). Los ixodicidas y LM han sido utilizados con éxito en el control de las garrapatas; sin embargo, su uso constante ha ocasionado la selección de poblaciones resistentes a la acción de los pesticidas (Rodríguez-Vivas et al. 2014).

Tabla 2. Ixodicidas y lactonas macrocíclicas en México para el control de garrapatas en el ganado bovino (Rodríguez-Vivas et al. 2014).

Familia	Principio Activo	Forma de aplicación
Organofosforados	Coumafos	Inmersión, aspersión
	Clorpirifos	Inmersión, aspersión
	Clorfenvinfos	Inmersión, aspersión
Piretroides sintéticos	Cipermetrina	Inmersión, aspersión, derrame dorsal
	Deltametrina	Inmersión, aspersión, derrame dorsal
	Flumetrina	Inmersión, aspersión, derrame dorsal
	Lambdacyalotrina	Derrame dorsal
	Alfacipermetrina	Inmersión, aspersión, derrame dorsal
Amidas	Amitraz	Inmersión, aspersión
Lactonas macrocíclicas	Ivermectina	Inyectable, derrame dorsal
	Moxidectina	Inyectable
	Doramectina	Inyectable
Fenilpirazoles	Fipronil	Derrame dorsal
Inhibidores del desarrollo	Fluazurón	Derrame dorsal

- **Aplicación de ixodicidas**

Se pueden emplear diferentes métodos para la aplicación de un ixodicida de acuerdo a las características del producto, como baño de inmersión, aspersión, aplicación epicutánea y aplicación parenteral. (Iturbide R. S. 2011).

a) Baño de inmersión: en esta técnica se sumerge al ganado en la solución ixodicida. Se ha visto que este método es el más efectivo para el control de las garrapatas; sin embargo, las instalaciones deben de contar con un corral de

acopio, manga de manejo, tina y escurridero, lo cual resulta muy gravoso para las pequeñas unidades de producción agropecuaria.

b) Baño de aspersión: Este procedimiento consiste en la aplicación del ixodicida mediante el uso de una bomba de rociado la cual puede ser accionada de manera manual o mecánica. Las instalaciones que se recomiendan son: un corral de acopio y una manga de manejo, en el cual se rocía el ixodicida a una presión constante, con lo que se asegura que el producto se disperse por toda la superficie corporal del animal.

c) Aplicación epicutánea: por este método se coloca el fármaco directamente en la piel del animal, por la línea media dorsal, desde la cruz hasta la región coccígea. El ixodicida se dispersa en la piel del animal y posteriormente es ingerido por el parásito.

d) Aplicación parenteral: Consiste en la inyección parenteral del fármaco, que al absorberse y alcanzar niveles sanguíneos adecuados, tienen efecto sobre las garrapatas que se encuentran alimentándose. (Iturbide R. S. 2011).

- **Desarrollo de un medicamento**

Para que un medicamento salga a la venta requiere años de investigación, inicia desde el descubrimiento o síntesis de una nueva molécula con posibles propiedades terapéuticas, a la cual se realizan estudios para comprobar su efecto en el organismo. Las etapas a completar son la pre-clínica, clínica y de registro del producto, y por último después del lanzamiento del medicamento: la farmacovigilancia. En la etapa pre-clínica se realizan los estudios de toxicidad, seguridad, identificación de propiedades del fármaco, biodisponibilidad, mecanismos de acción, estabilidad, etc. En los estudios clínicos se dividen en tres fases en donde se determinan forma farmacéutica, concentración terapéutica, efectos adversos, etc, pues en esta fase se estudia con poblaciones de individuos sanos y enfermos. Todos estos estudios se llevan a cabo por medio de una fuerte inversión monetaria hasta lograr su venta al público, y para poder considerarse un fármaco nuevo este no debe de haber sido utilizado anteriormente en el país.

- **Desarrollo farmacéutico**

El desarrollo tecnológico de un medicamento engloba conocimientos de preformulación, formulación, procesos de fabricación, operaciones básicas farmacéuticas, de elaboración y de control de medicamentos para su eficiencia, seguridad y estabilidad.

La tecnología farmacéutica tiene como objetivo generar un medicamento con las mejores características de estabilidad y presentación para que sea atractivo y funcional al consumidor, sin afectar las propiedades terapéuticas del fármaco.

Se busca tener productos innovadores los cuales resuelvan problemas actuales, y satisfagan las necesidades de la población sin generar efectos secundarios ni reacciones alérgicas.

- **Preformulación**

Los estudios de preformulación son aquellas pruebas que se realizan al principio activo y a los excipientes antes de realizar una formulación, tiene como finalidad conocer sus propiedades tanto físicas como químicas, el éxito de una formulación dependen de las pruebas a realizar y de toda la información obtenida. Comúnmente las pruebas determinan las características físicas, químicas, la solubilidad, el pH más estable, si existe o no presencia de polimorfos, además de conocer si hay reacción o no entre los excipientes o principio activo-excipientes, etc.

- **Suspensión farmacéutica**

La FEUM define una suspensión como un sistema disperso, compuesto de dos fases, las cuales contienen el o los fármacos y aditivos. Una de las fases, la continua o la externa es generalmente un líquido y la fase dispersa o interna, está constituida de sólidos (fármacos) insolubles, pero dispersables en la fase externa. Y como vías de administración tenemos: oral, parenteral, rectal, tópica, oftálmica. (FEUM, 2014).

También puede ser definida como una dispersión gruesa en la que partículas insolubles, generalmente de más de 1 μm de diámetro, están dispersas en un medio líquido, normalmente acuoso.

Una de las ventajas de una suspensión acuosa es que su forma farmacéutica es muy útil para administrar un fármaco insoluble o poco soluble. La enorme superficie del fármaco dispersado asegura una gran disponibilidad para la disolución y, por consiguiente, para la absorción. Las suspensiones acuosas pueden usarse también para la administración parenteral y oftálmica y representan una forma apropiada para la aplicación de sustancias dermatológicas sobre la piel. Las suspensiones se emplean también en veterinaria, siendo uno de los mejores aliados en el control de los insectos. Los pesticidas se presentan a menudo en forma de suspensiones para su uso como fungicidas, insecticidas, acaricidas y herbicidas (Aulton M. 2003).

Una suspensión aceptable debe poseer algunas cualidades deseables, entre otras el material suspendido no debe sedimentar demasiado rápido; las partículas que se posan en el fondo del recipiente no deben formar una masa dura, sino que deben dispersarse fácilmente formando una mezcla uniforme al agitar el recipiente, y la suspensión no debe ser demasiado viscosa y tiene que salir libremente del frasco o fluir por una aguja de jeringuilla.

Podemos definir la estabilidad física de una suspensión farmacéutica como la situación en la que las partículas no se agregan y permanecen distribuidas uniformemente por toda la dispersión. Dado que raras veces se logra esta situación ideal, conviene añadir que si las partículas sedimentan deben volver fácilmente a la suspensión mediante una agitación moderada.

La principal diferencia entre una suspensión farmacéutica y dispersión coloidal radica en el tamaño de las partículas dispersas: las partículas relativamente grandes de una suspensión son propensas a sedimentar debido a la fuerza de la gravedad. Aparte de esto, las suspensiones comparten la mayoría de las propiedades de los sistemas coloidales (Aulton M. 2003).

- **Tipos de suspensiones**

Generalmente las suspensiones se pueden clasificar en floculadas y defloculadas dependiendo si en el sistema encontramos la presencia flóculos o la ausencia de estos, teniendo en cuenta su comportamiento en el sistema.

- **Floculada**

Un sistema floculado ideal es aquel donde las partículas al sedimentar son resuspendidas fácilmente, ya que las moléculas aunque son de tamaños diferentes se mantienen humectadas, estas tienden a formar flóculos, los cuales son aglomeraciones de partículas que dependen de factores como el pH, el tiempo y el tamaño para sedimentar o resuspender dependiendo de sus características.

- **Defloculada**

En este tipo de sistemas las partículas se encuentran separadas por lo que su sedimentación depende del diámetro de cada una de estas, las de mayor tamaño sedimentarán más rápido que las pequeñas; las cuales estarán suspendidas provocando opalescencia.

Al ser muy lenta la velocidad de sedimentación las partículas no dan lugar a que un poco del líquido quede atrapado por lo tanto este es compacto y no resuspendible.

- **Componentes de una suspensión**

En una suspensión farmacéutica se pueden variar los componentes, pues dependiendo de lo que se busque en una formulación y de las características del fármaco algunos excipientes se considerarán necesarios, mientras otros no serán importantes.

Las suspensiones por lo general tienen fármacos insolubles en agua por lo cual necesitan excipientes que les ayuden a mantenerse suspendidos, al ser

hidrófobos requieren agentes surfactantes que disminuyan la tensión interfacial entre las moléculas y el medio.

- **Agentes surfactantes**

Los agentes surfactantes también son llamados tensoactivos, estos compuestos químicos tienen como objetivo disminuir la tensión interfacial entre las moléculas y el medio en el que se encuentran ya que actúan en la superficie de contacto entre dos fases, pueden humedecer, dispersar y solubilizar e incluso emulsificar manteniendo estabilidad en la solución. Se clasifican en:

- ✓ Aniónicos: Poseen carga negativa en una solución acuosa
- ✓ Catiónicos: Poseen carga positiva en una solución acuosa
- ✓ No iónicos: No poseen carga en una solución acuosa
- ✓ Anfóteros: Se pueden comportar como aniónicos o catiónicos dependiendo del pH.

- **Agentes viscosantes**

Los agentes viscosantes o agentes suspensoros se encargan de modificar la viscosidad de las suspensiones.

Por lo general, tenemos varios grupos como: polisacáridos, derivados hidrosolubles de la celulosa, silicatos hidratados, polímeros y el dióxido de sílice coloidal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Agentes suspensores (FMC biopolymer, 2014. Hernández, G., C 2015).

Agente suspensor	Comportamiento reológico	Carga iónica	Intervalo de concentración (%)
Derivados de celulosa			
Metilcelulosa	Pseudoplástico/plástico	Neutral	1-5
Hidroxiopropilmetilcelulosa	Pseudoplástico	Neutral	0.3-2
Carboximetilcelulosa sódica	Pseudoplástico	Aniónico	1-2
Celulosa microcristalina con carboximetilcelulosa sódica	Pseudoplástico/Tixotrópico	Aniónico	0.5-2
Polímeros			
Carbomero	Plástico	Aniónico	0.1-0.4
Povidona	Newtoniano/Pseudoplástico	Neutral	5-10
Gomas			
Goma xantana	Plástico/Tixotrópico	Aniónico	0.3-3
Carragenina	Newtoniano/Pseudoplástico	Aniónico	1-2

- **Conservadores**

Son compuestos químicos que evitan el crecimiento de microorganismos, evita procesos de oxidación y cambios químicos durante la fabricación, almacenaje hasta su consumo, pueden ser utilizados en mezcla para tener mayor efectividad.

El conservante debe permanecer estable en condiciones extremas de pH y temperatura, que no produzca ninguna reacción, una estructura química conocida, debe tener un amplio espectro de actividad antimicrobiana, ser compatible con los excipientes de la formulación. La clasificación de los conservadores depende de su estructura química como se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Tipos de conservadores

Conservador	Mecanismo de acción
Fenoles y derivados	Su efecto antimicrobiano está relacionado con los grupos fenólicos libres y la dependencia del pH. En este grupo encontramos a los parabenos que son ésteres de ácido p-hidroxibenzóico e incluyen los derivados metílicos, propílicos y butílicos. Son efectivos y estables a pH de 4 a 8.
Alcoholes alifáticos y aromáticos	Los alcoholes de cadena corta, como el etanol, poseen ya un efecto conservador. Algunos de estos conservadores presentan efecto anestésico local. Su pH óptimo es en medio ácido.
Compuestos orgánicos de mercurio	Son conservadores de elevada actividad bacteriostáticos y fungistáticos a concentraciones extraordinariamente pequeñas de 0.001 a 0.002%.
Compuestos de amonio cuaternario	Su efecto antimicrobiano se atribuye a su actividad tensoactiva en la membrana citoplasmica, alterando su permeabilidad de forma tóxica.
Ácidos carboxílicos	la actividad microbiana de los ácidos carboxílicos se atribuye a su toxicidad primaria, principalmente por su interferencia en los procesos metabólicos elementales de los microorganismos

(Flores, C. s.f).

- **Nanotecnología**

La nanotecnología es un campo multidisciplinario de la investigación que involucra el uso de nuevos dispositivos en el estudio de la materia a nivel molecular o supramolecular: las escalas características de la nanotecnología son de 1 a 100 nanómetros (nm). En estas escalas, la materia adquiere propiedades inesperadas y, a menudo diferentes de los mismos materiales en la micro o macro-escala: Se

deben considerar como nuevos compuestos químicos cuyas características de toxicidad son diferentes. Los nanomateriales están encontrando campos de aplicación en la industria: los nanotubos de carbono (CNT) (más fuerte y más ligero que el acero), las nanofibras de carbono (buena conductividad eléctrica, biocompatibilidad y resistencia necesarias para la creación de prótesis de músculo), nanopolvos (corrosión), nanoláminas (almacenamiento de datos).

La Nanobiología es una rama de investigación de la nanociencia y reúne químicos, biólogos, médicos y farmacéuticos. Una revisión exhaustiva de los diferentes tipos de nanopartículas (NP) y sus aplicaciones son inimaginables, las NP se utilizan en la medicina *in vitro* e *in vivo*. La versatilidad de estas nanopartículas es grande, ya que pueden ser diseñadas y configuradas para servir como portadoras de sustancias (terapéuticas), sondas de imagen (diagnóstico), o ambas cosas a la vez (teranóstico) (G. Chuto, Chaumet Riffaud, 2010).

La nanobiología, explora las propiedades de los nanomateriales para sus diversas aplicaciones biológicas y médicas. Podemos añadir funciones a los nanomateriales mediante la interacción con las estructuras o moléculas biológicas propias cuyo tamaño es lo suficientemente similar. El impacto de los nanomateriales es decisivo en la investigación y las aplicaciones en el contexto *in vivo* e *in vitro*.

La tecnología farmacéutica moderna desarrolla sistemas de entrega coloidales que promueven el paso transmembranal y / o moléculas intracelulares mediante la protección del ingrediente activo de la degradación por enzimas (por ejemplo, medicamentos entregados directamente al sitio de destino), la penetración intracelular maximiza la eficacia del ingrediente activo, incluyendo MDR-TB (tuberculosis multirresistente) por dar un ejemplo, que es una de las causas principales de fracaso del tratamiento contra el VIH o cáncer. (F. Prosie, FX Lesage, F. Deschamps 2008).

- **Nanopartículas**

Las nanopartículas (NP) son estructuras compuestas de cientos de miles de átomos. Debido a su tamaño (de 1 a 1000 nanómetros), y las propiedades físicas y químicas de estos nano-objetos son diferentes de las de los materiales convencionales. Su campo de desarrollo es muy amplio e incluye la investigación médica: se pueden distinguir dos grupos principales, nanopartículas orgánicas (sistema micelar, polímeros a base de NP, nanotubos de carbono, fullerenos) y nanopartículas inorgánicas (puntos *cuánticos*, NP de óxido de hierro magnético, las sondas de Raman) (G. Chuto, Chaumet Riffaud, 2010).

La característica de una nanopartícula reside en el hecho de que la mayoría de los átomos constituyen la superficie, por tanto, las nanopartículas tienen superficies de intercambio muy grandes, varios cientos de metros cuadrados por gramo de partículas. Esta superficie de intercambio es muy importante ya que da a las

nanopartículas sus propiedades físicas y químicas específicas que pueden causar efectos biológicos únicos (S. Lanone ,J. Boczkowski, 2010).

- **Nanosuspensión**

Utilizando las definiciones anteriores y teniendo en cuenta que es poco conocida una nanosuspensión se puede definir como una dispersión compuesta de dos fases: la continua o externa que suele ser líquido normalmente acuoso y la fase dispersa o interna constituida por el principio activo en tamaños menores a 500nm.

- **Carbamatos**

Los carbamatos son compuestos estables derivados del ácido carbámico (H₂N-COOH) el cual es a su vez inestable, los carbamatos resultan de sustituir el grupo amino y el grupo carboxílico por diversas estructuras y son identificados por la presencia del grupo -O-CO-NH- (Figura 5). Se obtienen muchas variaciones modificando los grupos unidos al oxígeno y nitrógeno (Muñoz C. C 2012).

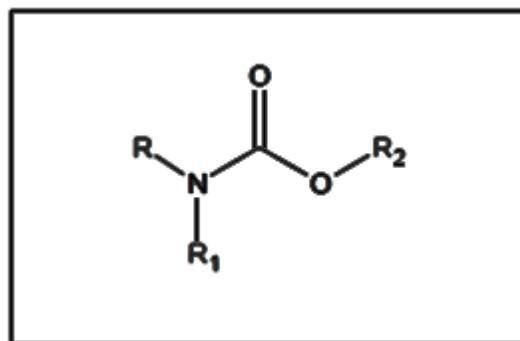


Figura 5. Estructura general del grupo carbamato (Muñoz C. C 2012).

Cuando el enlace carbamato está presente en un sistema cíclico, esta clase de compuestos se denominan como carbamatos cíclicos. Cuando el grupo carbamato está unido a cualquier átomo inorgánico, ya sea metálico o no metálico, tales compuestos se denominan carbamatos inorgánicos.

Los Carbamatos orgánicos representan una clase importante de compuestos que muestran varias propiedades interesantes. Ellos se encuentran una amplia utilidad en áreas, tales como productos farmacéuticos, agroquímicos (pesticidas, herbicidas, insecticidas, fungicidas, etc.), como productos intermedios en la síntesis orgánica, para la protección de los grupos amino en la química de péptidos, y como enlaces en la química combinatoria. Funcionalización de aminas en forma de carbamatos que ofrecen un método atractivo para la generación de derivados, que pueden tener propiedades medicinales y biológicas de interés. Los carbamatos orgánicos han sido ampliamente utilizados como moléculas sintéticas de importancia biológica. Por lo tanto, en el pasado reciente, se ha generado un interés considerable en el desarrollo de metodologías eficientes y seguras para la síntesis de éster de carbamato. (Chaturvedi, D., 2012).

Los Carbamatos orgánicos se han empleado frecuentemente como productos farmacéuticos en principios activos y profármacos. Por otra parte, el papel del enlace carbamato ha sido ampliamente estudiado en diversas estructuras de moléculas naturales y semisintéticas contra diversas enfermedades, puede ser utilizado como insecticida (Figura 6), antibacteriano, antifúngico, antipalúdico, antiviral, antiestrogénico, antiprogestacional, antiosteoporosis, anti-inflamatorio,

antifilariásicos, antituberculosos, antidiabético, anticonvulsivo, fármacos para el cáncer, Alzheimer y SNC (Chaturvedi, D., 2012).

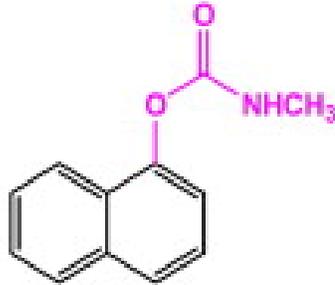


Figura 6. Estructura de Carbaril utilizado como insecticida (Chaturvedi, D., 2012).

- **Clasificación de los carbamatos**

Los carbamatos se pueden clasificar principalmente en dos grupos (figura 7): inorgánicos y orgánicos, como se mencionó anteriormente, dependiendo de las variaciones estructurales, de su acomodo en el espacio y de los enlaces que pueda llegar a tener, es que se clasifican, como se muestra en la siguiente figura:

- **LQM**

Los LQM son una serie de moléculas sintetizadas en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en el laboratorio de Química Medicinal a los cuales se han realizado pruebas para determinar su actividad terapéutica (antibiótica, antiparasitaria, antimicótica, etc.) en diferentes organismos.

El compuesto LQM 919 (etil-(4-bromofenil) carbamato) (Figura 8) ha demostrado en estudios *in vitro* su eficiencia para inhibir la reproducción de *R. microplus* en cepas que son susceptibles o resistentes a los acaricidas convencionales como organofosfatos, piretroides y amidinas.

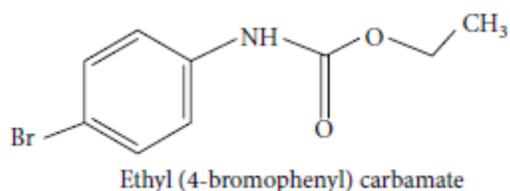


Figura 8. Estructura de LQM 919 (Prado-Ochoa MG 2013).

De acuerdo con estudios llevados a cabo en la FESC en la tabla se observa que no se requiere una gran cantidad del compuesto para inhibir al 95% el crecimiento de diferentes cepas de garrapatas, revelando que algunos de los compuestos de la serie LQM-900 tienen potencial actividad ixodocida (Muñoz C., C 2012).

En el caso de LQM 919 se muestra en la Tabla 5 la dosis mg/mL en 3 diferentes cepas en las que se ha probado.

La acción inhibitoria de AChE de los artrópodos provoca parálisis neuromuscular y la muerte por tetanización. Los carbamatos pueden ser potentes inhibidores de la AChE pero su inhibición no es tan prolongada como la producida por insecticidas organofosforados (Richardson, R. J., 2013. Martínez, D. 2016).

En el caso de los carbamatos LQM 919 Y LQM 996 son inhibidores débiles de AChE con solo 40% de inhibición AChE (Prado-Ochoa MG 2013).

Los resultados de estudios de Prado-Ochoa (2013) y colaboradores muestran que los efectos de los carbamatos estudiados en *R. microplus* son independientes de la inhibición de la AChE y sugieren que los principales efectos de los carbamatos evaluados son daños al ovocito, la inhibición de la ovogénesis y la inhibición de la maduración de ovocitos. Estos efectos son responsables de las reducciones en la cantidad y la viabilidad de los huevos producidos por las hembras tratadas, así como de los cambios morfológicos.

III. JUSTIFICACIÓN

La infestación de las garrapatas *Boophilus spp* en México se ha tratado de erradicar desde hace muchos años, se ha convertido en una epidemia la cual afecta al ganado bovino, animales silvestres, animales domésticos, etc. La infestación de garrapatas disminuye el peso de los animales, daña sus pieles y transmite enfermedades tanto a animales como a humanos, por eso la importancia de controlar este parásito.

Los ixodicidas para este tipo de tratamientos son por lo general: organofosforados, piretroides sintéticos, amidas e inhibidores del crecimiento, los cuales deben ser rotados junto con otras técnicas: como la quema de pastos para que se pueda controlar el crecimiento de garrapatas, y aun así sin ser efectivos al cien por ciento. Los medicamentos actuales para tratar este tipo de problemas son cada día menos eficientes, ya que las garrapatas por diferentes mecanismos metabólicos (generalmente) crean resistencia contra estos, provocando ineficiencia y pérdidas económicas a los principales productores del ganado bovino. El desarrollo de nuevas moléculas que no provoquen resistencia y que no dañen el medio ambiente son necesarias para eliminar este problema. En la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en el laboratorio de Química Medicinal se realizan síntesis de nuevos compuestos con posible actividad terapéutica los cuáles son estudiados. El LQM 919 ha probado ser efectivo contra el desarrollo de las garrapatas *Boophilus spp*, esta nueva molécula es un derivado del ácido carbámico y es una promesa en el tratamiento contra estos parásitos. Actualmente se evalúa también su ecotoxicidad en otros grupos de investigación, pero se cree que es más amigable con el ambiente que otros productos en el mercado. El desarrollar una formulación utilizando conocimientos en nanotecnología en el proceso de elaboración y con esta nueva molécula, se obtendrá un nuevo medicamento en el mercado, llegando a ser la mejor alternativa para el tratamiento de las garrapatas.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una nanosuspensión para la aplicación tópica de un derivado del ácido carbámico (LQM919) en ganado bovino contra el parásito *R. microplus* (garrapata).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar investigación documental y estudios de preformulación para establecer las condiciones de proceso y formulación.
- Optimizar la formulación farmacéutica evaluando tamaño de partícula como variable de respuesta y evaluar su efectividad en garrapatas *R. microplus*.
- Evaluar la estabilidad física de las formulaciones obtenidas sometiéndolas a condiciones de temperatura diferentes: frío y ambiente, observar si hay cambios significativos.

V. HIPÓTESIS

El desarrollo de una nanosuspensión estable con una nueva molécula derivada del ácido carbámico llamada LQM 919 (etil-(4-bromofenil) carbamato) que sea económica, práctica y fácil de administrar permitirá ser una nueva alternativa contra el tratamiento de garrapatas *R. microplus*.

VI

DESARROLLO

EXPERIMENTAL

- **MATERIALES Y MÉTODOS.**

Material de laboratorio

Agitador de vidrio
 Embudos de vidrio
 Espátulas
 Frascos de vidrio
 Frascos de vidrio color ámbar
 Gradillas
 Manguera para vacío
 Matraz Erlenmeyer
 Matraz kitazato
 Matraz volumétrico
 Papel filtro
 Pipetas graduadas
 Pipetas volumétricas
 Termómetro
 Tubos de ensaye
 Vasos de Precipitado

Tabla 6. Equipos e instrumentos

Equipo o instrumento	Marca	Modelo
Agitador magnético	IKA	3907500
Agitador con propela	Glas-Col	
Balanza analítica	Sartorius	BL1205
Estufa	Quincy Lab, Inc.	12-140E
Potenciómetro	OAKTON	4F9-500D
Refrigerador	TOR REY	
Zetazaizer	MALVERN	
Rotavapor	Heidolph	Laborota 4011

Tabla 7. Excipientes para la fabricación de una suspensión farmacéutica

Reactivo	Función
LQM 919	Principio Activo
Propilenglicol	Humectante
Metilparabeno	Conservador
Propilparabeno	Conservador
Quitósán.	Viscosante
Alginato	Viscosante
HPMC	Viscosante
PVA	Tensoactivo
Acetona	Disolvente
Pluronic F68	Tensoactivo

La metodología está representada en la Figura 10 donde se observa el resumen de la preformulación y la formulación.

- **METODOLOGÍA DE TRABAJO**

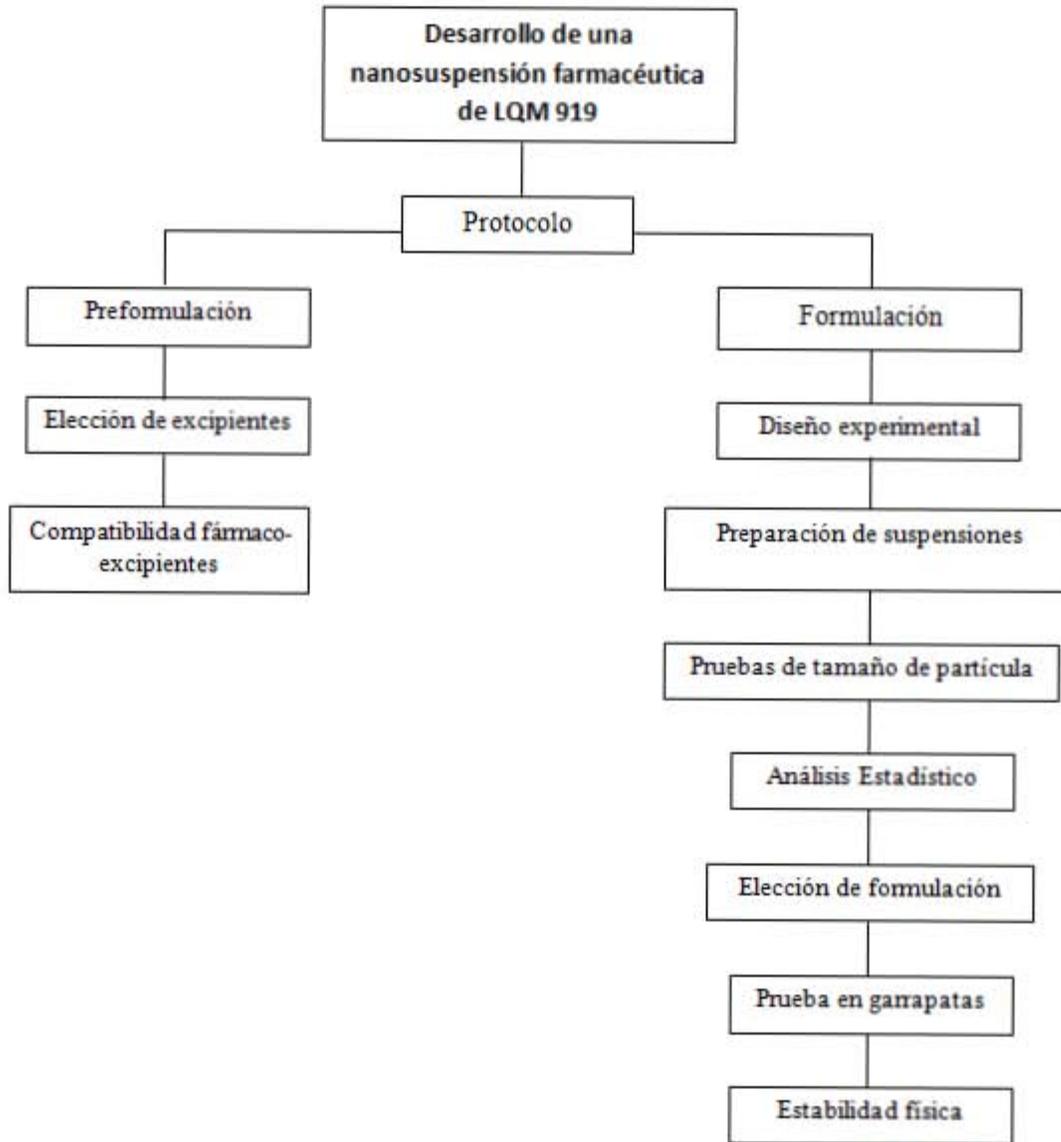


Figura 10. Metodología de Trabajo

PREFORMULACIÓN

Se recopiló información sobre los excipientes para la formulación, características del principio activo, y técnicas a utilizar en el desarrollo del proceso, y se definieron las condiciones de trabajo necesarias que permitieron cumplir con los objetivos planteados en este trabajo.

Pruebas de viscosidad de los polímeros

Las pruebas se realizaron en sistemas de 10mL.

La finalidad de esta prueba era conocer a que concentración eran más manejables los polímeros para una suspensión y así se realizaron las pruebas de compatibilidad entre excipientes y principio activo.

Se inició con las concentraciones de referencia de cada uno de los polímeros comenzando por la menor como se indica a continuación:

1. Se pesó la cantidad necesaria de viscosante para obtener la concentración reportada en la literatura para una suspensión en sistemas de 10mL.
2. Se agregó a un vaso de precipitados con 10mL de agua y se disolvieron mediante agitación.
3. Se observó la solución formada y se determinó cualitativamente si la viscosidad era funcional en una suspensión tópica.

Prueba de incompatibilidades entre excipiente y principio activo

1. Se disolvieron en 20 mL de acetona 13.36 mg de LQM 919, y se etiquetó el sistema como A. La dosis del compuesto LQM es de 0.668mg/mL, la cual ya estaba establecida en los trabajos de investigación de Prado-Ochoa, MG (2013).
2. Se solubilizó en 5 mL de propilenglicol, 40 y 20 mg de metilparabeno y propilparabeno respectivamente. Se etiquetó el sistema como B. Las concentraciones en la formulación son de 0.025% y 0.05% de propilparabeno y metilparabeno respectivamente estas concentraciones entran en las recomendadas Merck Index, en suspensiones tópicas ya que pueden abarcar concentraciones de 0.01 a 0.6%.
3. Se solubilizó el polímero (con sus respectivas cantidades en base al diseño de experimentos correspondiente) en 15 mL de agua, teniendo en cuenta que se le sumarán 5mL llevando a un volumen de 20mL al final. Se etiqueta el sistema como C.
4. Se mantuvo el sistema C en agitación y se agregó el sistema B. Se agitó la mezcla hasta homogeneizar.
5. Con un gotero se agregó el sistema A al sistema C y se agitó durante 30 minutos.
6. La mezcla obtenida en el paso anterior se llevó al rotavapor y se ajustaron las siguientes condiciones: 40°C, 100 rpm, 450 a 550 mmHg de presión,

dichas condiciones se mantuvieron 10 minutos para evaporar toda la acetona del sistema.

7. Se observaron los sistemas y se anotaron las observaciones pertinentes.

Proceso de elaboración de formulaciones de HPMC y Alginato

1. Se disolvieron en 20 mL de acetona 13.36 mg de LQM 919 ya que la dosis es de 0.668mg/mL. Se etiqueta el sistema como A.
2. Se solubilizó en 5 mL de propilenglicol, 40 y 20 mg de metilparabeno y propilparabeno respectivamente. Se etiquetó el sistema como B.
3. Se solubilizó el polímero HPMC o alginato en 15 mL, (dependiendo de las condiciones mostradas en las tablas 8 y 9) teniendo en cuenta que se le sumarán 5mL llevando a un volumen de 20mL al final. Se etiqueta el sistema como C.
4. Se mantuvo el sistema C en agitación y se agregó el sistema B. Se agitó la mezcla hasta que fuera homogénea.
5. Con un gotero se agregó el sistema A al sistema C y se agitó las revoluciones y el tiempo indicado en el diseño de experimentos (ver tablas 8 y 9).

Tabla 8. Diseño de experimentos para formulaciones con HPMC

Concentración de HPMC (%)	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)
4	1000	15
4	370	30
7	1000	30
7	370	15
4	370	15
7	370	30
4	1000	30
7	1000	15

Tabla 9. Diseño de experimentos para formulaciones con alginato

Concentración de Alginato (%)	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)
1	1000	15
1	370	15
1	1000	30
1	370	30
0.6	1000	30
0.6	1000	15
0.6	370	15
0.6	370	30

6. La mezcla obtenida en el paso anterior se llevó al rotavapor y se ajustaron a las siguientes condiciones: 40°C, 100 rpm, 450 a 550 mmHg de presión, dichas condiciones se mantuvieron 10 minutos para evaporar toda la acetona del sistema.
7. Se observaron los sistemas y se midió el tamaño de partícula.

Proceso de elaboración de formulaciones de Quitosán

1. Se disolvieron en 20 mL de acetona 13.36 mg de LQM 919 ya que la dosis es de 0.668mg/mL. Se etiquetó el sistema como A.
2. Se solubilizó en 5 mL de propilenglicol, 40 y 20 mg de metilparabeno y propilparabeno respectivamente. Se etiquetó el sistema como B.
3. Se solubilizó en 15 mL de ácido acético al 1% el Quitosán y PVA o Pluronic, como se indica en el diseño de experimentos (ver Tabla 10). Se tuvo en cuenta que se le sumaban 5mL para un volumen de 20mL al final. Se etiquetó el sistema como C.
4. Se mantuvo el sistema C en agitación y se agregó el sistema B. Se Agitó la mezcla hasta que era homogénea.
5. Con un gotero se agregó el sistema A al sistema C y se agitó durante 30 minutos a 1000rpm.
6. La mezcla que se obtuvo en el paso anterior se llevó al rotavapor y se ajustaron a las condiciones: 40°C, 100 rpm, 450 a 550 mmHg de presión, dichas condiciones se mantuvieron 10 minutos para evaporar toda la acetona del sistema.
7. Se observaron los sistemas y se midió el tamaño de partícula

Tabla 10. Diseño de experimentos para formulaciones con Quitosán

Concentración de polímero	Tipo de tensoactivo	Concentración tensoactivo
0.7	PVA	1.0
0.3	PVA	0.5
0.7	Pluronic	1.0
0.3	Pluronic	1.0
0.3	Pluronic	0.5
0.3	PVA	1.0
0.7	Pluronic	0.5
0.7	PVA	0.5
0.7	PVA	1.0
0.3	PVA	0.5
0.7	Pluronic	1.0
0.3	Pluronic	1.0
0.3	Pluronic	0.5
0.3	PVA	1.0
0.7	Pluronic	0.5
0.7	PVA	0.5

Para el segundo diseño de experimentos con quitosán se siguió la misma metodología anterior solo cambiando las concentraciones de PVA como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Segundo Diseño de experimentos para formulaciones con Quitosán

Concentración de Quitosán (%)	Concentración PVA (%)
0.5	0.7
0.75	0.3
0.75	0.7
0.5	0.3
0.5	0.5
0.75	0.5
1	0.5
1	0.3
1	0.7

Prueba de inmersión de hembras repletas

Esta técnica se realizó en colaboración con la Dra. Sandra Lizeth Iturbe Requena en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de Parásitos de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Selección del material biológico: Se seleccionaron las garrapatas hembras eliminando aquellas demasiado pequeñas o muy grandes (Figura 11). Las hembras se pesaron en una balanza.



Figura 11. Recolección de garrapatas. (Iturbe, R., 2017)

Después se pesaron los grupos, seleccionados e identificados como testigos y tratados, y se procedió a preparar el ixodicida a evaluar (Figura 12).



Figura 12. Distribución de garrapatas en lotes (Iturbe, R., 2017)

Tratamiento: En un frasco de vidrio limpio de boca ancha tipo "Gerber", se añadió una porción de la solución garrapaticida, en la que se sumergen los especímenes de un grupo durante 30 minutos; transcurrido este tiempo, se vació el contenido en otro recipiente provisto de un colador, eliminando el excedente sobre un papel secante. Las garrapatas se alojaron en cajas Petri (Figura 13).



Figura 13. Garrapatas preparadas para incubación (Iturbe, R., 2017)

Incubación: Todas las cajas con las garrapatas tratadas se colocaron en una estufa de incubación a una temperatura de 27°C y una humedad relativa de 80%; siete y catorce días después del tratamiento, se evaluó la capacidad del producto de inhibir la oviposición en las garrapatas tratadas.

Se procedió a retirar los huevos ovipositados, los cuales se pesaron y se colocaron en viales de vidrio que se tapan con una torunda de algodón, incubándose bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad antes descritas. Se determinó el efecto sobre la eclosión de los huevos y se mantuvieron en la estufa durante 25 días; transcurrido ese tiempo, se procedió a sacrificar por congelación las larvas resultantes tanto de los grupos testigos como los tratados. Una vez secos los viales, el contenido se homogeneizó perfectamente.

Análisis de resultados: Con los datos del peso de garrapatas en cada grupo y el peso de la oviposición, se calculó el porcentaje de inhibición de oviposición como sigue:

Porcentaje de oviposición (%Op): Se calculó tomando los datos del número de hembras que ovipositaron de cada grupo tratado y su testigo empleando la fórmula:

$$\frac{\text{HEMBRAS QUE OVIPOSITARON} * 100}{\text{HEMBRAS TOTALES}} = \%Op$$

Porcentaje de inhibición de la oviposición (%InhOp): Para calcular este parámetro primero se calculó el índice de oviposición (IO) tomando el peso de los huevos y las hembras, y posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición de la

oviposición tomando los datos de IO del grupo tratado y el IO del grupo testigo, con las formulas siguientes:

$$\frac{\text{PESO DE LOS HUEVOS (g)}}{\text{PESO DE LAS HEMBRAS (g)}} = \text{IO}$$

$$\frac{\text{IO GRUPO TESTIGO} - \text{IO GRUPO TRATADO}}{\text{IO GRUPO TESTIGO}} * 100 = \% \text{InhOp}$$

Porcentaje de eclosión (%Ec): Se calculó tomando los datos del número de cascarones y huevos no eclosionados colocados en el campo de 100 mm² (microscopio óptico Olympus CH30) empleando la fórmula:

$$\frac{\text{NO. DE CASCARONES} * 100}{\text{NO. DE CASCARONES} + \text{NO. HUEVOS}} = \% \text{Ec}$$

De esta manera se obtuvo el parámetro principal de la evaluación "*in vitro*" de ixodicidas (Porcentaje de inhibición de la oviposición (%InhOp)) a la concentración recomendada para su uso en los animales, sobre garrapatas hembras repletas. Rango de aceptación; 100% de %InhOp de control obligatorio (ZOO NOM-006 ZOO-1993)

Estabilidad de la formulación

1. Se tomo una muestra de 20mL de la formulación y se sometió a dos temperaturas diferentes: en refrigerador ($4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) y a temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$).
2. Se observaron a los tres y seis meses, buscando desarrollo de algún tipo de precipitado o formación de agujas.
3. También se observó si hay crecimiento de microorganismos y se reportó.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la preformulación se investigaron propiedades de los excipientes y en el caso del LQM 919 los datos que se tienen sobre características se encuentran en la Tabla 12, también se realizaron pruebas para determinar si se presentaba alguna interacción entre los excipientes y el LQM 919.

Tabla 12. Características del LQM 919.

Característica	Observación
Aspecto	Cristales blancos amorfos
Soluble	Acetona y acetato de etilo
Insoluble	Agua
Punto de fusión	82-84°C
Dosis	0.633 mg/ mL

Primero se realizaron pruebas a los diferentes viscosantes en donde se determinó la concentración en que eran adecuadas para una suspensión. Estas concentraciones fueron con las que se trabajó, el criterio se dejó a evaluación del formulador, siendo totalmente cualitativo, puesto que todavía faltaba realizar un diseño de experimentos. Los resultados de esta prueba se muestran en la Tabla 13 en ella se indica las concentraciones que se consideraron adecuadas para esta formulación, las concentraciones de referencia se obtuvieron del Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed., 2009. y las concentraciones utilizadas (%) se obtuvieron de la experimentación. Al tener como objetivo una suspensión tópica para ganado bovino no requiere alta viscosidad simplemente que se adhiera a la piel del animal.

Tabla 13. Concentración del viscosante utilizado en la nanosuspensión.

Polímero	Tipo de polímero	Concentración de referencia (%)	Concentración utilizada (%)
Viscarin GP 209 NF	Carragenina	0.1-1.0	0.5
Carragenina 812	Carragenina	0.3-1.0	0.2
Carragenina 379	Carragenina	0.3-1.0	0.2
CMC	Derivado de la celulosa	0.25-1.0	1
HPMC	Polímero	0.5-10	7
Alginato	Polisacárido	1-5	1
Quitósán	Polisacárido	1-3	1

Los resultados para la elección del viscosante a utilizar se muestran en la Tabla 14 se reportan las observaciones de las diferentes formulaciones a temperatura ambiente y en frío, y de manera objetiva se revisó si las suspensiones realizadas presentaban algún tipo de precipitado o turbidez. Los resultados obtenidos fueron favorables en el caso del Alginato, el HPMC y el Quitósán (temperatura ambiente), estos no presentaban precipitado ni formación de agujas, comparados con los viscosantes: Viscarin GP 209 NF, Carragenina 812, Carragenina 379 y CMC los cuales si presentaron problemas como precipitados, turbidez y formación de agujas. Por lo que se eligieron el Alginato y HPMC, ya que Quitósán si se encontraba totalmente transparente en temperatura ambiente pero en frío presentaba una pequeña cantidad de agujas.

Tabla 14. Prueba de incompatibilidades entre excipiente y principio activo.

Polímero	Concentración (%)	Condiciones de temperatura		Observaciones
		Frío	Ambiente	
Viscarin GP 209 NF	0.5%	Presencia de agujas	Presencia de agujas	Elevada concentración de agujas
Carragenina 812	0.2%	Gelificó Presencia de agujas	Gelificó sin agujas	Turbia
Carragenina 379	0.2%	Partículas suspendidas	Presencia de agujas	Formación de gel
CMC	1%	Turbia	Turbia Presencia de agujas	Turbia
HPMC	7%	Sin presencia de agujas	Sin presencia de agujas	Transparente
Alginato	1%	Sin presencia de agujas	Sin presencia de agujas	Transparente
Quitosan	1%	Presencia de agujas	Sin presencia de agujas	Transparente

El diseño de experimentos es un método estadístico el cual ayuda a determinar los factores que influyen en alguna respuesta de interés. En este caso se utilizó para determinar la mejor formulación, pues se tenían variables como el tiempo, la velocidad de agitación y las proporciones de los excipientes.

El diseño de experimentos y análisis estadístico se realizó en el programa STATGRAPHICS Centurión. Se consideraron las diferentes concentraciones del Alginato y del HPMC para la experimentación.

El proceso que se implementó fue una evaporación del solvente con un rotavapor, se realiza la formación de una emulsión de solvente y activo en agua, se evapora

el solvente para dejar al activo insoluble en el agua formando una suspensión de tamaño nanométrico, este proceso tiene la finalidad de disminuir el tamaño de partícula del LQM 919 a proporciones nano y como el LQM 919 es prácticamente insoluble en agua es de esperarse que aumente la estabilidad de la nanosuspensión al evitar que precipite y se degrade.

HPMC

Los resultados de la formulación con HPMC se muestran en la tabla 15 se reportan las condiciones a las que se realizó cada formulación y el tamaño de partícula que se obtuvo.

Tabla 15. Resultados sobre el tamaño de partícula de las formulaciones con HPMC como polímero.

Concentración de HPMC (%)	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)	Tamaño de partícula (nm)
4	1000	15	2634
4	370	30	1887
7	1000	30	15.7
7	370	15	2657
4	370	15	2812
7	370	30	13.08
4	1000	30	1886
7	1000	15	10.97

Analizando los datos del Diagrama de Pareto estandarizado 1. Donde A representa la concentración de polímero, C el tiempo y B la velocidad de agitación. BC es el efecto de la combinación de tiempo y velocidad de agitación. AB la combinación de la concentración del polímero y la velocidad de agitación.

AC la combinación del tiempo y la concentración del polímero. Los signos – y + representan si tienen un efecto positivo o negativo con esto se obtiene que ninguno de los factores es significativo pues no afectan el tamaño de partícula, los cambios son mínimos.

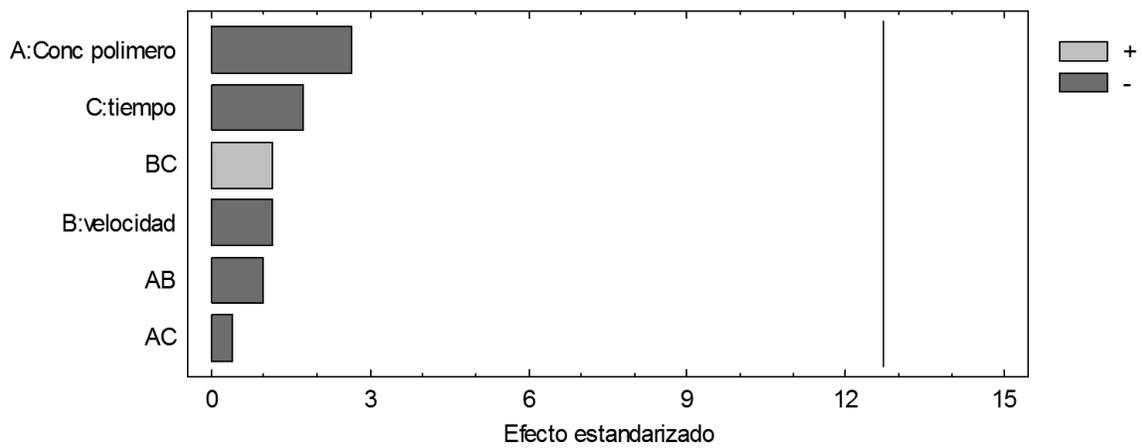


Diagrama de Pareto estandarizado 1. Respuesta tamaño de partícula cuando HPMC es utilizado como viscosante.

En la Grafica 1 se indica como la concentración de 7% del polímero disminuye el tamaño de partícula, la velocidad de agitación está ligeramente inclinada a 1000rpm como óptima y 30 minutos con respecto al tiempo influyen en el tamaño de partícula para disminuirlo.



Grafica 1. Efectos principales para la variable tamaño de partícula con HPMC.

En la Tabla 16 se muestra la combinación de los niveles y los factores, para minimizar el tamaño de partícula y obteniendo como resultados que el tiempo óptimo es de 30 minutos, una velocidad de 1000 rpm y una concentración de HPMC de 7.0%.

Tabla 16. Optimización de la respuesta para diseño de experimentos de HPMC

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Concentración polímero (%)	4.0	7.0	7.0
Velocidad (rpm)	370.0	1000.0	1000.0
Tiempo (min)	15.0	30.0	30.0
Meta: minimizar tamaño de partícula Valor óptimo = 293.256			

ALGINATO

En la tabla 17 se muestran los resultados del experimento con Alginato donde se observan la concentración de viscosante en cada formulación, las condiciones a las que se realizó y su tamaño de partícula.

Tabla 17. Resultados sobre el tamaño de partícula de las formulaciones con Alginato como viscosante.

Concentración de Alginato (%)	Velocidad (rpm)	Tiempo (min)	Tamaño de partícula (nm)
1	1000	15	406.4
1	370	15	170.7
1	1000	30	357.9
1	370	30	309.5
0.6	1000	30	171
0.6	1000	15	190
0.6	370	15	187.7
0.6	370	30	172.1

Analizando estos datos en el Diagrama de Pareto estandarizado 2. Donde A representa la concentración de polímero, B la velocidad de agitación y C el tiempo. AB la combinación de la concentración del polímero y la velocidad de agitación, BC es el efecto de la combinación de tiempo y velocidad de agitación, AC la combinación del tiempo y la concentración del polímero. Los signos – y + representan si tienen un efecto positivo o negativo en el tamaño de partícula. En el diagrama se puede ver que ninguna variable tiene efecto positivo ni negativo en el tamaño de partícula de la suspensión.

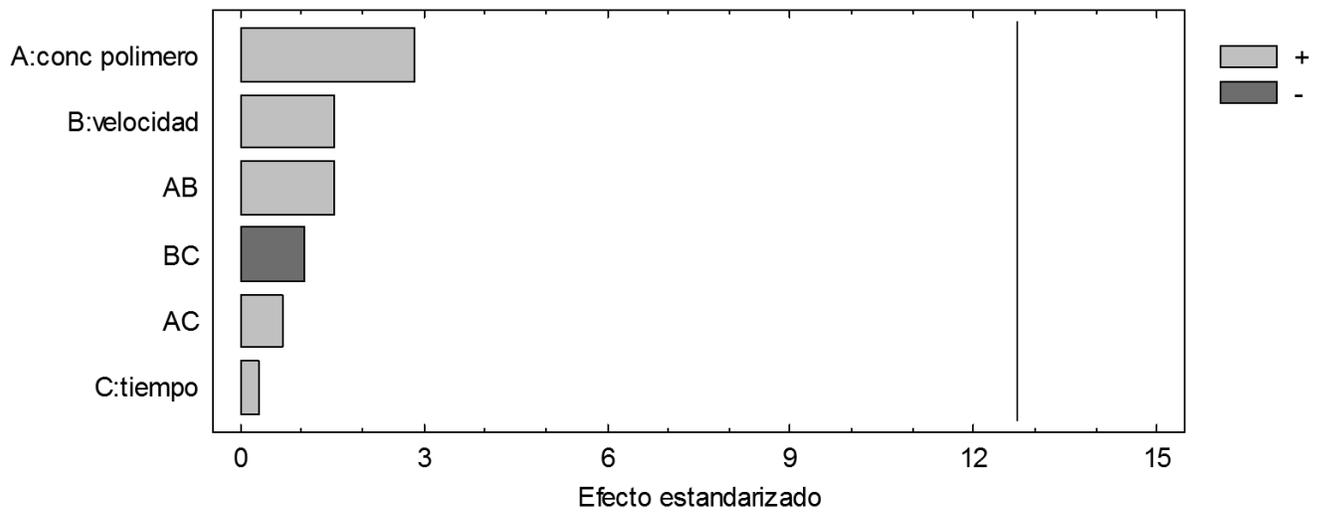
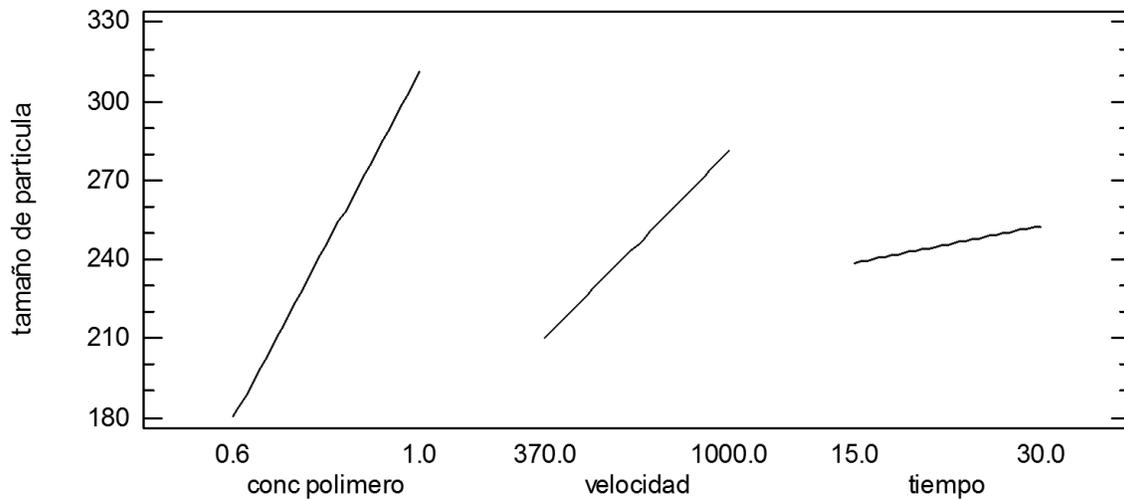


Diagrama de Pareto estandarizado 2. Respuesta tamaño de partícula cuando el Alginato se utiliza como viscosante.

En la Grafica 2 se indica que la concentración del polímero de 0.6 disminuye el tamaño de partícula e igualmente la velocidad de agitación a 370 rpm, en este caso el tiempo no influye en el tamaño de partícula, pues la línea casi es horizontal por lo que no es significativa.



Grafica 2. Efectos principales para la variable tamaño de partícula cuando el Alginato se usa como viscosante.

En la Tabla 18 se muestra la combinación de los niveles de los factores, y la cual tiene como objetivo minimizar el tamaño de partícula, indicando que una concentración de 0.6 de Alginato, 1000 rpm y 30 minutos son los valores óptimos para lograr una disminución en el tamaño de partícula.

Tabla 18. Optimización de la respuesta para el diseño de experimentos cuando el Alginato se usa como viscosante.

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Concentración polímero (%)	0.6	1.0	0.6
Velocidad (rpm)	370.0	1000.0	1000.0
Tiempo (min)	15.0	30.0	30.0
Meta: minimizar tamaño de partícula Valor óptimo = 148 nm			

Con lo anterior se determinó que el tiempo y la velocidad de agitación no son factores que afectan el tamaño de partícula.

Resultados de la prueba de inmersión de hembras repletas

El objetivo de esta prueba fue determinar el porcentaje de control que ofrece un producto a la concentración comercial recomendada sobre garrapatas hembras repletas *Boophilus spp.* (NOM-006-ZOO-1993).

En la tabla 19 se muestran los datos obtenidos de la Técnica de inmersión de hembras repletas con las formulaciones de HPMC y Alginato, donde se encuentran el peso de las garrapatas, de los huevecillos, su cantidad y el número de cascarones. En la figura 13 se muestran las garrapatas y los huevecillos ovipositados después de la prueba.

Tabla 19. Datos obtenidos de la prueba *in vitro* de inmersión de hembras repletas

Formulación	Repeticiones	Peso (g) hembras	Peso (g) huevecillos	No. de huevecillos	No. de cascarones
Formulación de HPMC	A1	3.4482	0.7604	239	126
	A2	3.4599	1.2941	295	133
	A3	3.5623	1.3432	351	197
Blanco HPMC	B1	3.503	0.9696	286	118
	B2	3.3377	1.5536	262	155
	B3	3.3601	1.3693	221	89
Formulación de Alginato	C1	3.2805	1.0682	412	54
	C2	3.3631	1.1923	389	35
	C3	3.3405	0.9755	422	47
Blanco Alginato	D1	3.3137	1.6373	247	104
	D2	3.5799	1.6278	188	95
	D3	3.312	1.4123	174	93
Testigo de agua	E1	3.1852	1.4461	236	71
	E2	3.3629	1.6367	173	90
	E3	3.4103	1.5388	207	69

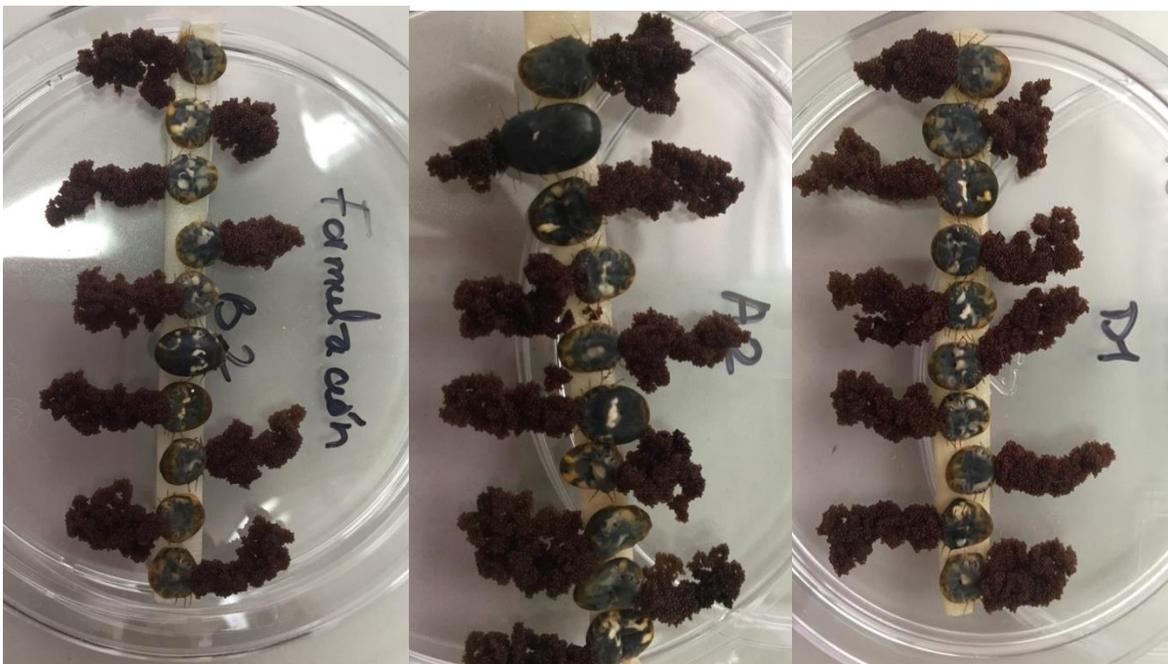


Figura 14. Garrapatas *R. microplus* después de la prueba de inmersión de hembras repletas.

Los tres parámetros importantes de esta prueba son: el porcentaje de oviposición, el porcentaje de inhibición de la oviposición y el porcentaje de eclosión, estos datos revelan el efecto del fármaco en las garrapatas. En la tabla 20 se muestran estos resultados indicando que en %Op (Porcentaje de oviposición) fue de 83 y 96 % en HPMC y Alginato respectivamente, estos son comparados con el testigo de agua que obtuvo 100%. El %InhOp (Porcentaje de inhibición de la oviposición) en el testigo de agua fue de un 0% comparado con 30% de las dos formulaciones probadas, este parámetro para ser aceptado debe estar entre un 98% y 100% para la garrapata *R. microplus*.

En el caso del %Ec (Porcentaje de eclosión) determina el porcentaje de los huevecillos que son viables y se compara con el testigo.

Tabla 20. Resultados de las pruebas de inmersión de hembras repletas.

	Formulación de HPMC	Formulación de Alginato	Testigo de agua
%Op	83	96	100
%InhOp	30.2	30.1603	0
%Ec	33.8	9.9	27

No se obtuvo ningún efecto de las dos formulaciones probadas en las garrapatas *R. microplus*. se comenzó con un nuevo diseño de experimentos con el viscosante Quitosán.

QUITOSÁN

Un tercer polímero se utilizó para determinar la mejor formulación, esté a comparación de los anteriores propuestos está en ácido acético al 1% y se utilizaron tensoactivos para mantener suspendido el LQM 919. En la Tabla 21 se reportaron las observaciones del Quitosán junto con tensoactivos a diferentes pH's, en donde se eligió un rango de pH de 2-2.5 donde no hay precipitado, hay que tener en cuenta que se debe calentar el PVA para lograr que se solubilice más rápido, sin calentar a más de 70°C.

Tabla 21. Prueba de Quitosán a diferentes pH's y tensoactivos

	pH	2	3	4	5
CS	Pluronic	Completamente transparente	Completamente transparente	Transparente	Precipitado
	PVA	Transparente Poco Precipitado	Transparente Precipitado	Transparente Precipitado	Transparente Precipitado

Los resultados de las formulaciones de Quitosán se muestran en la Tabla 22 donde el tamaño de partícula de las diferentes formulaciones seguida de tamaños de agujas y cantidad de agujas. En estas formulaciones se obtuvieron resultados diferentes a los anteriores pues las formulaciones desarrollaron agujas, a estas se les asigno un valor dependiendo de la longitud de estas agujas y de su cantidad para su análisis los cuales se reportan en la Tabla 23.

Tabla 22. Resultados del diseño de experimentos de Qitosán con diferentes tensoactivos.

Concentración de polímero (%)	Tipo de tensoactivo	Concentración tensoactivo (%)	Tamaño de partícula (nm)	Tamaño de agujas	Cantidad de Agujas
0.7	PVA	1.0	2095	0	0
0.3	PVA	0.5	18.45	1	2
0.7	Pluronic	1.0	1539	1.5	1
0.3	Pluronic	1.0	1361	1	2
0.3	Pluronic	0.5	250.8	0.5	1
0.3	PVA	1.0	348.9	0.5	3
0.7	Pluronic	0.5	1189	0.5	1
0.7	PVA	0.5	254.7	0.5	0.5
0.7	PVA	1.0	2353	0.5	2
0.3	PVA	0.5	16.33	0.5	3
0.7	Pluronic	1.0	1913	1.5	1
0.3	Pluronic	1.0	1317	1	2
0.3	Pluronic	0.5	162.5	0.5	3
0.3	PVA	1.0	170.2	0.5	1
0.7	Pluronic	0.5	1441	1	3
0.7	PVA	0.5	275.7	0	0

Tabla 23. Ponderación a tamaño y cantidad de agujas. Se muestra como se cambia la respuesta cualitativa por cuantitativa.

Tamaño de agujas	Ponderación	Cantidad de agujas*	Ponderación
Menor 5 mm	0.5	Poca presencia de agujas	1
Entre 5-15 mm	1	Moderada cantidad de agujas	2
Mayor a 15mm	1.5	Gran cantidad de agujas	3

*Criterio formulador

Por lo que se realizaron los análisis de cantidad de agujas, tamaño de agujas y tamaño de partícula para cada una de estas respuestas se obtuvo un diagrama de

Pareto combinando los factores(Diagrama 3), una gráfica de efectos principales (Gráfica 3).

Tamaño de partícula

Para analizar el tamaño de partícula se tiene el Diagrama de Pareto estandarizado 3, donde C representa la concentración de tensoactivo, A concentración del polímero y B el tipo de tensoactivo. AC la combinación de concentración del polímero y concentración del tensoactivo. AB la combinación de concentración del polímero y el tipo de tensoactivo. BC es el efecto de la combinación del tipo y concentración del tensoactivo. Los signos – y + representan si tienen un efecto positivo o negativo. En el diagrama se observa que la concentración de tensoactivo y la concentración de quitosán afectan positivamente (aumentando) al tamaño de partícula.

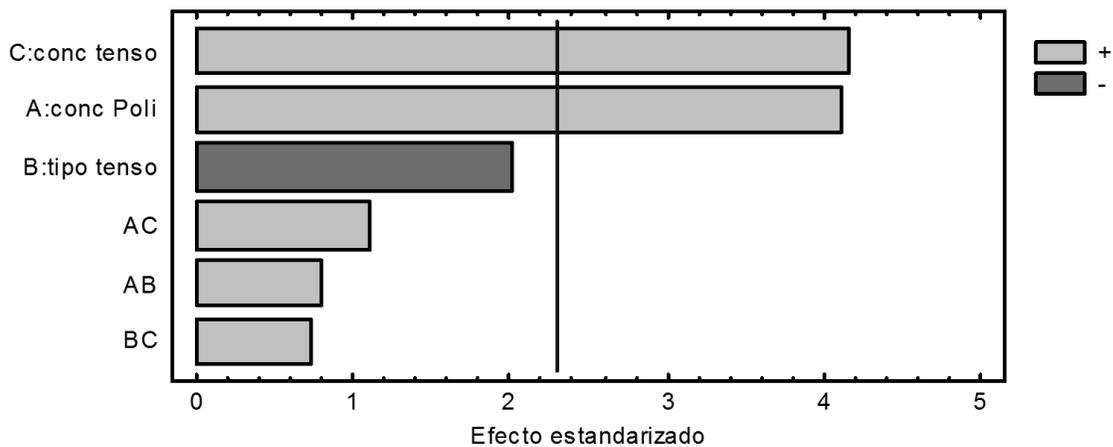
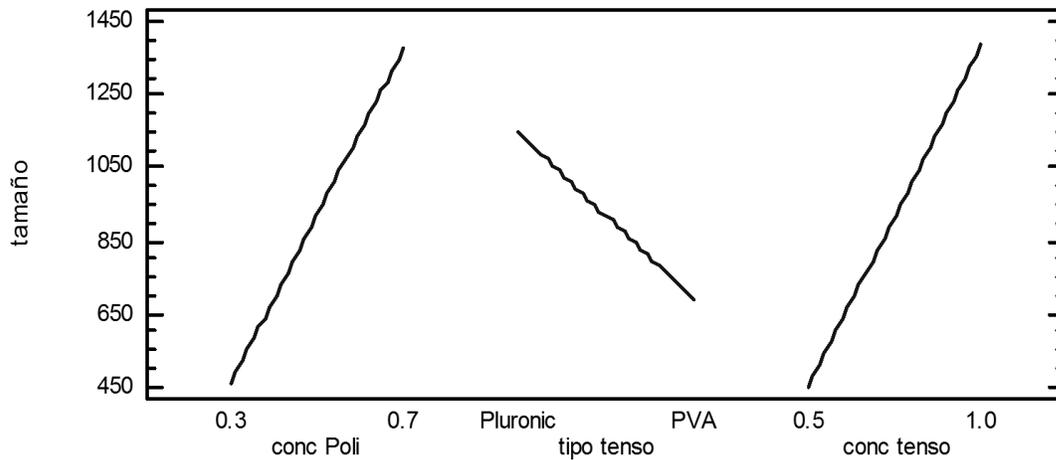


Diagrama de Pareto estandarizado 3. Respuesta tamaño de partícula con Quitosán.

En la Grafica 3 se muestra que una concentración de 0.3% del polímero reducen el tamaño de partícula en comparación de 0.7% que la aumenta, en el caso del tensoactivo el PVA al 0.5% es el que ayuda a disminuir el tamaño de partícula.



Grafica 3. Efectos principales para la variable tamaño de partícula con Quitosán.

Tamaño de agujas

Al ser una respuesta inesperada en las formulaciones, a las agujas se les asignó un valor para poder analizarlo, para su tamaño o longitud, en el Diagrama de Pareto estandarizado 4, donde C representa la concentración de tensoactivo, A concentración del polímero y B el tipo de tensoactivo. AC la combinación de concentración del polímero y concentración del tensoactivo. AB la combinación de concentración del polímero y el tipo de tensoactivo. BC es el efecto de la combinación del tipo y concentración del tensoactivo. Los signos – y + representan si tienen un efecto positivo o negativo, como se muestra el tensoactivo afecta

negativamente en el tamaño de agujas y sus combinaciones con las demás respuestas provocan la misma respuesta.

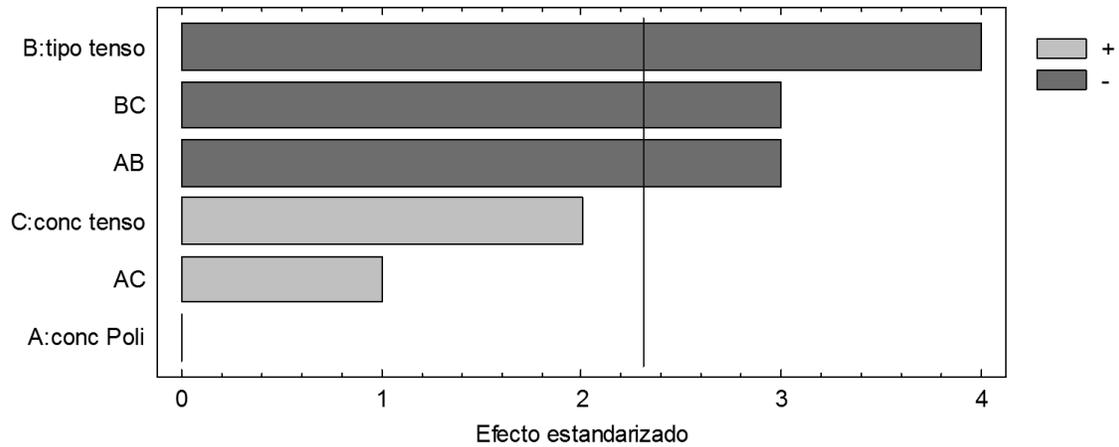
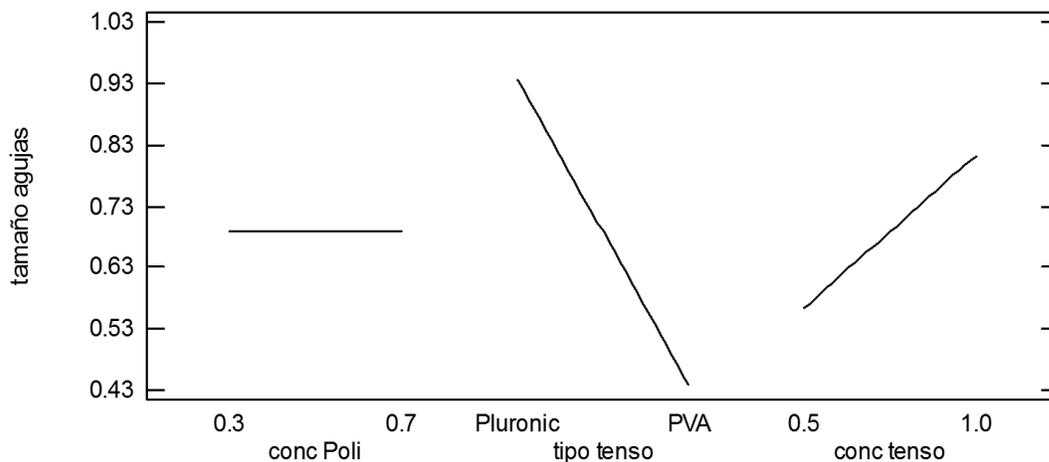


Diagrama de Pareto estandarizado 4. Respuesta: tamaño de agujas con Quitosán.

En el caso de Gráfica 4 donde se indican como la concentración del polímero no influye en el tamaño agujas al estar en una línea completamente horizontal y el tensoactivo a elegir sería el PVA pues una concentración de PVA al 0.5% las disminuye.



Gráfica 4. Efectos principales para tamaño de agujas con Quitosán.

Cantidad de agujas

La cantidad de agujas también se le dio un valor numérico dependiendo de qué tanta concentración se observaba en el Diagrama de Pareto estandarizado 5, donde C representa la concentración de tensoactivo, A concentración del polímero y B el tipo de tensoactivo. AC la combinación de concentración del polímero y concentración del tensoactivo. AB la combinación de concentración del polímero y el tipo de tensoactivo. BC es el efecto de la combinación del tipo y concentración del tensoactivo. Los signos – y + representan si tienen un efecto positivo o negativo como se muestra, por lo que ningún factor es significativo.

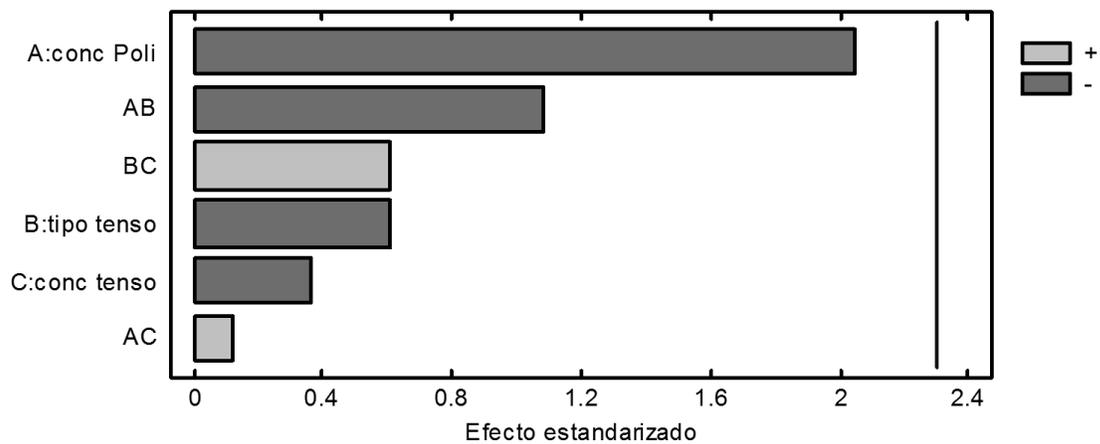
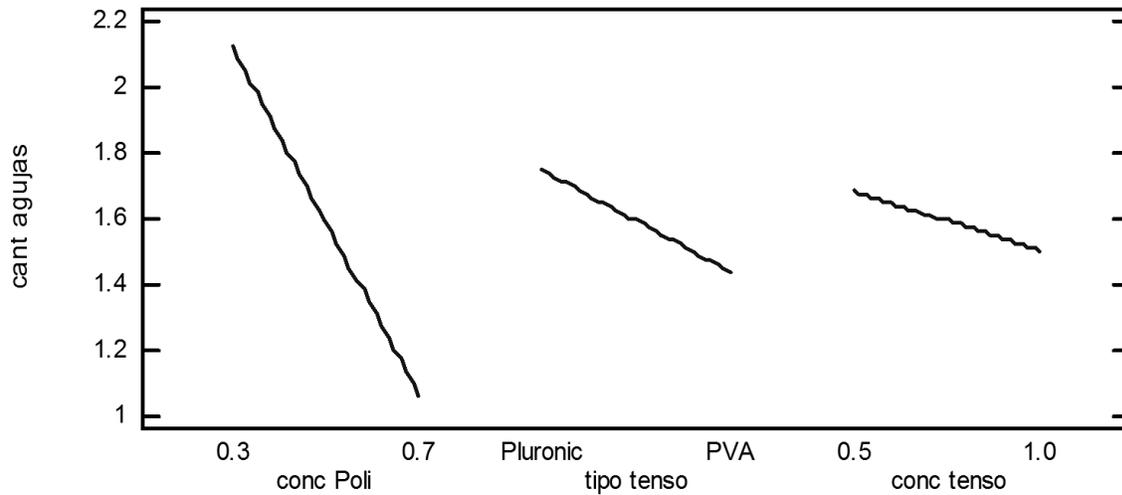


Diagrama de Pareto estandarizado 5. Respuesta cantidad de agujas con Quitosán

En la Gráfica 5 se indica como la concentración del polímero a 0.7% disminuye el tamaño de partícula, el tipo de tensoactivo y su concentración estaban ligeramente inclinadas a PVA al 1.0 por lo que solo influyeron poco en la cantidad de agujas.



Gráfica 5. Efectos principales para la variable cantidad de agujas con Quitosán.

En las tres gráficas de Efectos principales para Quitosán se indica que el PVA es el que reduce tamaño de partícula, cantidad de agujas y tamaño de agujas.

La formación de agujas no se encontraron en todos los sistemas por lo que se decidió seguir con el análisis y así determinar que formulación no presentaba este problema y realizar una optimización de la formulación.

Optimización

Segundo Diseño experimental con Quitosán.

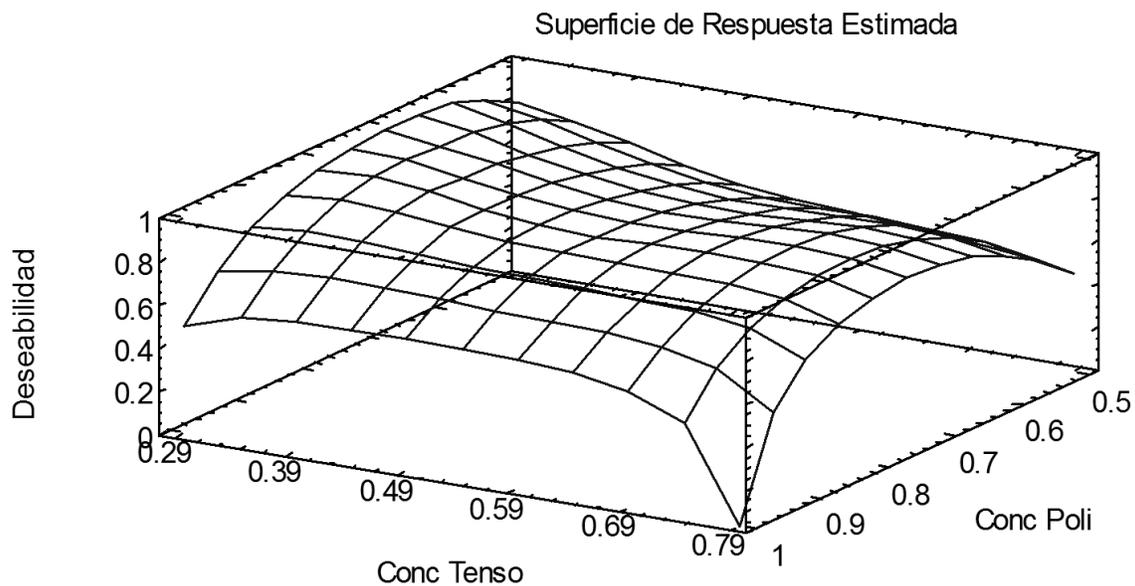
Se realizó un segundo diseño de experimentos en donde los factores a analizar fueron la concentración de Quitosán, y la concentración del tensoactivo PVA. La optimización de una formulación ayuda a encontrar los mejores resultados posibles.

Los resultados de este nuevo diseño se observan en la Tabla 24 donde se observan disminuidas las formulaciones con agujas, con estos datos se realizó el análisis estadístico.

Tabla 24. Resultados de tamaño de partícula de las formulaciones con Quitosán y PVA a diferentes concentraciones

Concentración de Quitosan (%)	Concentración PVA (%)	Tamaño de partícula (nm)	Tamaño de agujas	Cantidad de Agujas
0.5	0.7	231.2	0.5	0.5
0.75	0.3	178.2	0	0
0.75	0.7	941	0	0
0.5	0.3	212.6	0	0
0.5	0.5	1410	1	0.5
0.75	0.5	212.7	0	0
1	0.5	390.5	0	0
1	0.3	363.9	0.5	3
1	0.7	361.4	0.5	3

En la Gráfica 6 se encuentran 3 ejes y se mide la deseabilidad (disminuir tamaño de partícula, el tamaño de agujas y su cantidad) donde para el PVA está en el nivel bajo, este es 0.3% y en el caso del polímero esta entre 0.6 y 0.7% este tipo de gráficas ayudan a visualizar como los factores en conjunto y en sus niveles influyen en las respuestas.



Grafica 6. Optimización de múltiples respuestas para diseño de experimentos de Quitosán.

En la Tabla 25 se reportan las concentraciones óptimas de la concentración del Quitosán y la concentración del PVA.

Tabla 25. Optimización de las variables de Quitosán

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
Concentración Quitosán (%)	0.5	1.0	0.68
Concentración PVA(%)	0.3	0.7	0.3

Análisis de la formulación

Para que una suspensión farmacéutica pueda competir en el mercado no debe ser de un costo elevado, tiene que ser estable y tener instrucciones claras para su uso. Para alcanzar el objetivo de una formulación estable y efectiva es necesario tener en cuenta la forma farmacéutica y las características del principio activo, y así lograr una buena elección de excipientes. En la formulación se dio prioridad a mantenerse en suspensión al principio activo (LQM 919) para que se lograra una adecuada estabilidad física. En Tabla 26 se muestran los ingredientes de la formulación final y las funciones que cumplen y en la Figura 15 se observa una muestra de la suspensión en la cual no se observa algún tipo de precipitado ni formación de agujas y su viscosidad es adecuada para su administración.

Tabla 26. Formulación final de la nanosuspensión con Quitosán

Compuesto	Función	Concentración
Quitosán	Viscosante	0.5 %
Metilparabeno	Conservador	0.05%
Propilparabeno	Conservador	0.025%
Propilenglicol	Humectante/conservador	25%
PVA	Tensoactivo	0.3%
Agua	Medio	74%

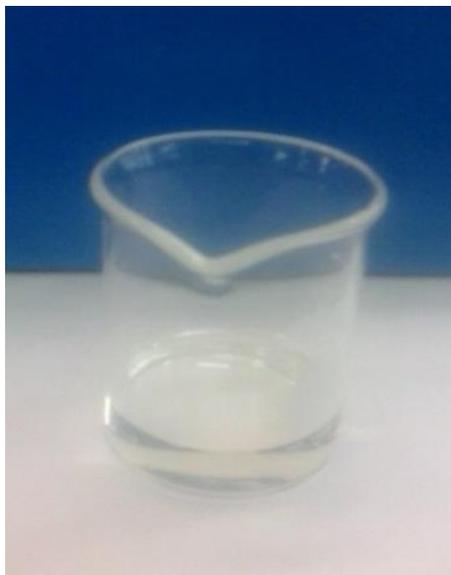


Figura 15. Formulación final de la nanosuspensión con Quitosán.

En la formulación, el propilenglicol se considera una base hidrosoluble que tiene una acción emoliente (impidiendo la desecación de la epidermis en su capa córnea) y protectora de la piel (impidiendo la acción de irritantes). A elevada concentración ($> 40\%$) tiene acción queratolítica. (ACOFARMA s.f). Los conservadores seleccionados fueron el metilparabeno y el propilparabeno, debido a sus propiedades fungicidas y bactericidas y en este caso fueron muy efectivo.

Los viscosantes son compuestos que cumplen con la función de mantener una viscosidad en el sistema, llegan a funcionar como protectores, en este caso el Quitosán puede formar una capa sobre la piel.

Prueba de inmersión de hembras repletas con la formulación de Quitosán

En la Figura 16 se observa que las garrapatas al ser expuestas a la formulación tenían muy debilitados los caparazones, por lo que era imposible manipularlas sin provocar un sangrado, esto ocasionó la muerte de las garrapatas y en ese momento se terminó esta prueba sin calcular ninguno de los parámetros expuestos.

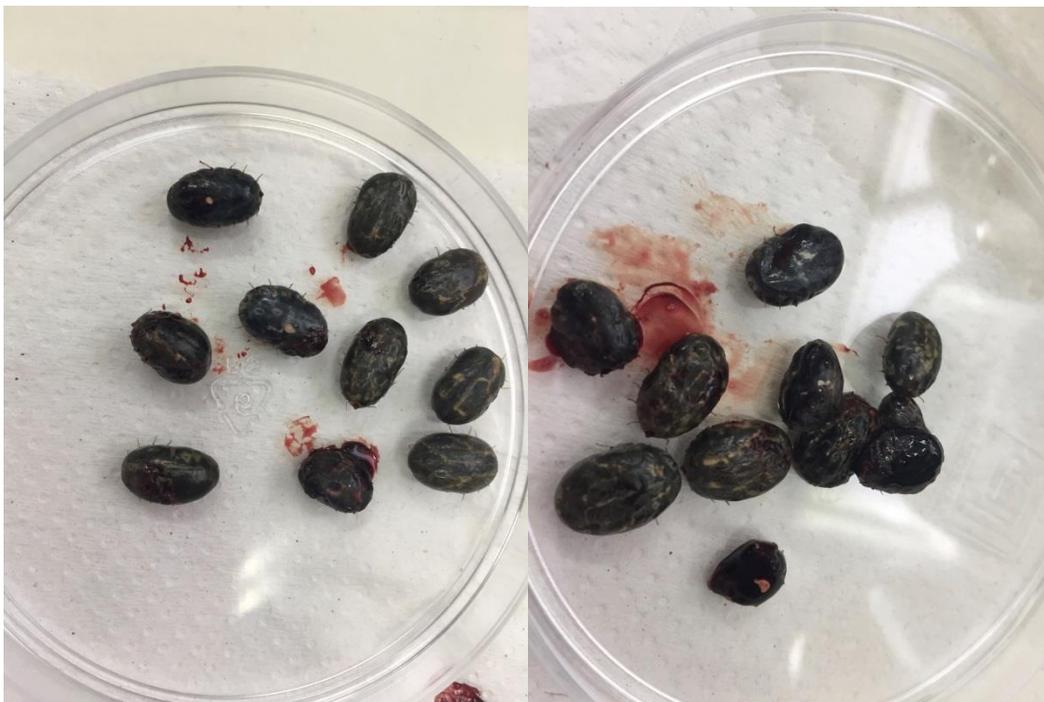


Figura 16. Garrapatas después de técnica de inmersión de hembras repletas con formulación de Quitosán.

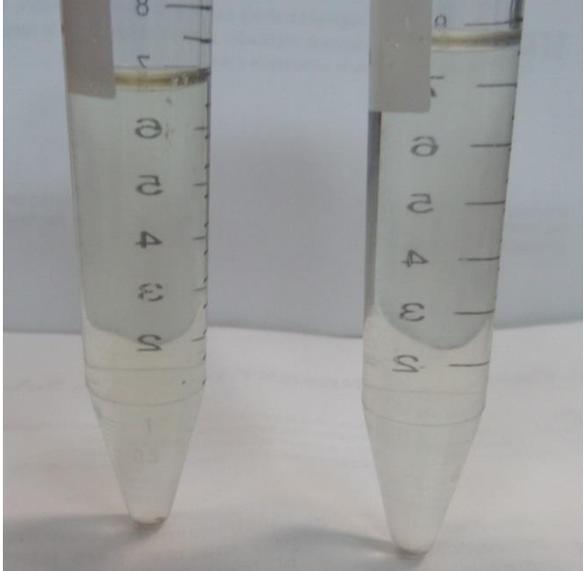
Nosotros creemos que el medio donde se fabricaron las nanopartículas de quitosán (ácido acético al 1%), provocó que el exoesqueleto de las garrapatas se debilitara, y tuvieron sangrado. Debemos de realizar nuevas pruebas para saber

exactamente que pasó o si hubo alguna interacción entre los componentes de la formulación, que no fue considerada en el diseño. Como quiera que fuese, este es un efecto benéfico para nuestra formulación y su efecto ixodicida. Pero si necesitamos saber los porque y los como de esta respuesta totalmente inesperada.

Estabilidad de la formulación

Al ser el LQM 919 insoluble en agua debe estar suspendido para mantenerse estable por esto se eligió un humectante como el propilenglicol pues aparte de esta propiedad es un cosolvente y un conservador. En la Tabla 27 se muestran las formulaciones a temperatura ambiente y en frío después de tres y seis meses. Las formulaciones no presentan ningún tipo de precipitado, ni formación de agujas o crecimiento de microorganismos, por lo que su estabilidad física se considera adecuada.

Tabla 27. Estabilidad de la formulación final de la nanosuspensión con Quitosán.

Tiempo	Imagen	Observaciones
3 meses	 <p data-bbox="435 961 1003 1003">Izquierda: 20°C a 32°C°. Derecha: 4°C.</p>	<p data-bbox="1068 636 1377 814">No hay crecimiento de microorganismos, ni formación de agujas o precipitado</p>
6 meses	 <p data-bbox="435 1623 1003 1665">Izquierda: 20°C a 32°C°. Derecha: 4°C.</p>	<p data-bbox="1068 1266 1377 1444">No hay crecimiento de microorganismos, ni formación de agujas o precipitado</p>

VIII

CONCLUSIONES

- Se encontraron interacciones, como precipitados y formación de agujas entre el principio activo LQM 919 y los viscosantes: Viscarin GP 209 NF, Carragenina 812, Carragenina 379 y CMC que fueron analizados en la preformulación.
- Se obtuvieron dos formulaciones con viscosantes diferentes: HPMC y Alginato las cuales no produjeron ningún efecto en las garrapatas *R. microplus*.
- Mediante el diseño de experimentos de cribado y de optimización se realizaron los análisis de las formulaciones con lo que se eligió la formulación óptima, la cual fue elaborada con el polímero quitosán, que fue con el único polímero que se vio un efecto ixodicida sobre las garrapatas *R. microplus*. Se determinó que el tiempo y las revoluciones por minuto no afectan el tamaño de partícula de la nanosuspensión, las condiciones óptimas de proceso y de formulación, fueron las siguientes: tiempo 30 minutos a una velocidad de 1000 rpm y una concentración de 0.5% de Quitosán.
- Se obtuvo una nanosuspensión acuosa de LQM 919 y quitosán como viscosante la cual se mantuvo estable por más de seis meses en diferentes condiciones de temperatura: ambiente (aproximadamente 22°C) y en frío (aproximadamente de 2 a 6°C), ambas en tubos falcon de 30 mL, en donde no se observó precipitado, turbidez o crecimiento de microorganismos.

IX

PERSPECTIVAS

- Investigar más propiedades fisicoquímicas del compuesto LQM 919 ya que la información es muy escasa.
- Continuar con los estudios *in vivo* ya en un modelo animal en campo y así relacionar los resultados obtenidos *in vitro* y con animales en corral para conocer el efecto ya en la práctica.
- Llevar a cabo el escalamiento de la formulación y llegar a obtener un registro sanitario para la formulación.

X

BIBLIOGRAFÍA

- ACOFARMA. (s.f) Ficha de Información Técnica Propilenglicol
<http://www.acofarma.com/admin/uploads/descarga/4257-dec0525952d91caba371957d3a73cdaa33233fb3/main/files/Propilenglicol.pdf>
- Alonso-Díaz M A , Rodríguez-Vivas R I, Fragoso-Sánchez H, Rosario-Cruz R (2006), Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas Arch. Med. Vet. 38, 2.
- Alonso-Díaz M A, Rodríguez-Vivas R I, Fragoso-Sánchez H, Rosario-Cruz R (2006) Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas Arch. Med. Vet. 38, N° 2
- Angeles E., Martínez P., Keller J., Martínez, R., Rubio, M., Ramírez,G., Castillo, R., López-Castañares, R., Jiménez, E. (2000), Ethyl and methylphenylcarbamates as antihelmintic agents: theoretical study for predicting their biological activity by PM3 J. Mol. Struct. : THEOCHEM., 504, 141-170.
- Aulton M. (2003) Farmacia la ciencia del diseño. (2da edición) Elseiver. p.p 30-75.
- Avila, S. B. (2014) Síntesis de 5 nuevos carbamatos con actividad ixodicida en garrapatas del género *Boophilus* (Tesis de Licenciatura) UNAM. México.
- Bayer HealthCare (s.f) Manual Bayer de la Garrapata. Recuperado de:
<https://www.sanidadanimal.bayer.com.mx/es/animales-productivos/bovinos/manuales-bayer/manual-bayer-de-la-garrapata.php>
 Consultado Junio 2017

- BUCHI (s.f) Manual de instrucciones Rotavapor R II
http://www.equipar.com.mx/web2012/wp-content/uploads/2012/info_man/buchi/Manual_Operacion_RII.pdf
- Cabrera-Jiménez, D., Rodríguez-Vivas, R., Rosado-Aguilar, J. (2008) Evaluación de la resistencia a la cipermetina en cepas de campo de *Boophilus microplus* obtenidas de ranchos bovinos del estado de Yucatán, México Téc Pecu Méx 46(4):439-448
- Chaturvedi, D. (2012). ChemInform Abstract: Perspectives on the Synthesis of Organic Carbamates. Cheminform, 43(15), no. doi:10.1002/chin.201215225
- Chuto G., Chaumet R, y el Grupo de Oncología de la Sociedad Francesa de Medicina Nuclear e Imagen Molecular (SFMN). (2010) Nanopartículas Medicina 34, (6), 370-376.
- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (2014) Tomo I y II. 11ª Ed. Secretaria de Salud.
- Flores, C. (s.f) Antioxidantes y conservadores utilizados en la industria farmacéutica. Consultado en Mayo 2017 en <https://www.academia.edu/12106351/CONSERVADORES>
- Flores, M. A. (2010). Síntesis, caracterización y evaluación biológica de los derivados del ácido carbámico para el tratamiento de la parasitosis producida por las garrapatas (*Boophilus microplus*). Tesis de licenciatura. México. UNAM.

- Fragoso, S., H. y Soberanes, C., N. (2001) Control de la resistencia a los ixodicidas a la luz de los conocimientos actuales. Memorias de XXV Congreso Nacional de Buiatria. Veracruz, Veracruz, México. Asociación Mexicana de Médicos especialistas en Bovinos, A.C. Pp. 40-48.
- Handbook of Pharmaceutical Excipients (2009) 6th ed.
- Hernández, G., C (2015) Elaboración de un guión experimental para la fabricación de una suspensión de Benzoil Metronidazol para el laboratorio de Tecnología Farmacéutica. Tesis de licenciatura. México UNAM.
- Iturbide R. S. (2011) Eficacia de nuevos compuestos derivados del ácido bórico sobre garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Tesis de licenciatura. México. UNAM.
- Lanone, S., & Boczkowski, J. (2010). Sources of nanoparticles. *Revue Francaise D'allergologie*, 50(3), 211-213. doi:10.1016/j.reval.2010.01.039
- Martínez, D. (2016) Síntesis de cinco nuevos compuestos derivados del ácido carbámico con posible actividad ixodicida en garrapatas del género *Rhipicephalus*. Tesis de licenciatura. México. UNAM.
- Muñoz C. C (2012) Síntesis de derivados del ácido carbámico de la serie LQM -900, los cuales han mostrado actividad ixodicida. Tesis de licenciatura. México UNAM
- Mutz, I. (2009) Las infecciones emergentes transmitidas por garrapatas. Recuperado de: www.karger.com Ann Nestlé [Esp] 2009;67:123–134 DOI: 10.1159/000287275 Consultado Junio 2017

- NOM-006-ZOO-1993 NORMA OFICIAL MEXICANA REQUISITOS DE EFECTIVIDAD BIOLÓGICA PARA LOS IXODICIDAS DE USO EN BOVINOS Y METODO DE PRUEBA.
<http://legismex.mty.itesm.mx/normas/zoo/zoo006.pdf>
- NORMA Oficial Mexicana NOM-019-ZOO-1994, Campaña nacional contra la garrapata *Boophilus spp.*
- Prado-Ochoa, MG (2013) Mecanismo de acción y toxicidad (los nuevos carbamatos con efecto sobre garrapatas *Rhipicephalus microplus* (*Boophilus microplus*). Tesis doctoral. México. UNAM
- Prosie F., Lesage FX, Deschamps F. (2008) Nanopartículas: Estructuras, usos y efectos en la salud Presse Med, 37, pp. 1431-1437
- Richardson, R. J. (2013) Anticholinesterase Insecticides. Reference Module in Biomedical Sciences, 13, 433-444.
- Rodríguez-Vivas, R., et al. (2014) Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. Ecosistemas y Sistemas Agropecuarios, 1(3), 295-308.
- SENASICA (2017) Control de Garrapatas *Boophilus microplus*
<https://www.gob.mx/senasica/acciones-y-programas/campana-nacional-para-el-control-de-la-garrapata-boophilus-spp>
- Tapia, P., G. (2004) Un Modelo para predecir el tiempo que tarda para desarrollarse la resistencia de las garrapatas *Boophilus microplus* a los acaricidas Tesis Doctoral UNAM México D.F