



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN

“Estudio de biodisponibilidad transdérmica de Ivermectina formulada en un emulgel, como una nueva alternativa para el tratamiento antiparasitario.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA:

VICTOR ANDRES TRENADO HERNÁNDEZ



**UNAM
CUAUTILÁN**

ASESOR: DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MEX.

2018



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.



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: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR 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

Estudio de biodisponibilidad transdérmica de Ivermectina formulada en un emulgel, como nueva alternativa para el tratamiento antiparasitario.

Que presenta el pasante: **Victor Andres Trenado Hernández**
Con número de cuenta: 307150459 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 nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Febrero de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.F.C. Ma. Eugenia R. Posada Galarza	
VOCAL	Dra. Susana E. Mendoza Elvira	
SECRETARIO	Dr. David Quintanar Guerrero	
1er. SUPLENTE	Dra. Elizabeth Piñón Segundo	
2do. SUPLENTE	L.F. Miguel Ángel Trejo Rodríguez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres.

Por estar ahí cuando los necesite e incluso cuando no; a ti mamá por todas aquellas desveladas a mi lado, por tu preocupación cuando estaba enfermo y por darme el mejor ejemplo de una mujer capaz, entregada y fuerte. A ti papá por apoyarme siempre que pudiste, por darme una meta a seguir y por mostrarme que lo importante es no darte por vencido.

A mi asesor y profesores.

El Dr. David Quintanar Guerrero, por la orientación y ayuda que me brindó para la realización de esta tesis, por su apoyo y amistad que me permitieron aprender mucho más que lo estudiado en el proyecto. Al Dr. Juan Pablo Martínez Labat, por su apoyo, y por el material y equipo que me prestaron para concluir este proyecto.

A todos mis profesores de la licenciatura en Farmacia que me enseñaron tanto de la profesión como de la vida, impulsándome siempre a seguir adelante.

A mis amigos y compañeros de generación.

Siempre estuvieron pendientes de mi progreso universitario día con día y me dieron su apoyo cuando lo necesite sin pedirme nada a cambio. Ustedes me acompañaron a lo largo de este proceso de que todas las cosas salieran bien y de que no tomara una mala decisión, les agradezco la confianza que depositaron en mí para poder estar siempre en las buenas y las malas juntos. Gracias por confiar y creer en mí y haber hecho de mi etapa universitaria un trayecto de vivencia que nunca voy a olvidar.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado la vida y permitirme el haber llegado hasta este momento tan importante de mi formación profesional

De igual forma, dedico esta tesis a mi Madre, Victoria Hernández Escobar, que ha sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, lo cual me ha ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles.

A mi padre, Andrés Trenado Mora, quien con sus consejos ha sabido guiarme para culminar mi carrera profesional, por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor.

*“El hombre encuentra a Dios detrás de cada
puerta que la ciencia logra abrir.”*

Albert Einstein

ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
1.	Infecciones por parásitos.....	3
1.1.	Parasitología en perros y gatos.....	4
1.1.1.	Clasificación de parásitos por órgano.....	5
1.1.1.1.	Parásitos intestinales.....	5
1.1.1.2.	Parásitos del corazón y vermes pulmonares.....	6
1.1.2.	Vías de infección de parásitos.....	6
1.1.2.1.	Parasitosis en el hombre.....	8
1.1.2.2.	Parasitosis en los animales.....	8
1.2.	Diagnóstico.....	9
1.2.1.	Animales.....	9
1.2.2.	Humanos.....	9
1.3.	Tratamiento.....	9
1.3.1.	Endectocidas (lactonas macrocíclicas).....	10
1.3.1.1.	Características generales.....	10
1.3.1.2.	Clasificación.....	10
1.3.2.	Ivermectina.....	11
1.3.2.1.	Características de la ivermectina.....	11
1.3.2.2.	Propiedades Físicoquímicas.....	12
1.3.2.3.	Propiedades Farmacológicas.....	12
1.3.2.3.1.	Mecanismo de Acción.....	12
1.3.2.4.	Propiedades farmacocinéticas.....	14
1.3.2.4.1.	Formulaciones y vías de administración.....	15
1.3.2.4.2.	Distribución.....	15
1.3.2.4.3.	Metabolismo y excreción.....	15
1.4.	Farmacocinética.....	16
1.4.1.	Conceptos generales de farmacocinética.....	16
1.4.1.1.	Absorción.....	17
1.4.1.2.	Distribución.....	18
1.4.1.3.	Biotransformación.....	18
1.4.1.4.	Excreción.....	18

1.4.1.5.	Modelos Compartimentales.....	20
1.5.	Parámetros farmacocinéticos.....	23
1.5.1.	Constantes de velocidad.....	23
1.5.2.	Volumen de distribución.....	24
1.5.3.	Aclaramiento.....	24
1.5.4.	Biodisponibilidad.....	25
1.6.	Sistemas para vía percutánea.....	27
1.6.1.	Estructura de la piel canina.....	28
1.6.2.	Absorción percutánea.....	30
1.6.2.1.	Moduladores de absorción.....	31
1.6.3.	Selección de los fármacos para un sistema transdérmico.....	34
1.7.	Emulgel.....	35
1.8.	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.....	36
1.8.1.	Instrumentación.....	36
1.8.2.	Aspectos importantes en el análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).....	37
1.9.	Cuantificación de fármacos en fluidos biológicos.....	39
1.9.1.	Tratamiento de muestras biológicas.....	40
1.10.	Validación de métodos bioanalíticos.....	41
1.11.	Análisis de muestras.....	44
III.	OBJETIVOS.....	46
A.	OBJETIVO GENERAL.....	46
B.	OBJETIVOS PARTICULARES.....	46
IV.	PARTE EXPERIMENTAL.....	47
4.1.	Material, equipos e instrumentos.....	48
4.1.1.	Material.....	48
4.1.2.	Equipos e instrumentos.....	48
4.1.3.	Reactivos.....	49
4.2.	Preparación de Soluciones.....	49
V.	METODOLOGÍA.....	51
5.1.	Determinaciones previas.....	51
5.1.1.	Elaboración del emulgel.....	51
5.1.2.	Evaluaciones al emulgel.....	53
5.2.	Desarrollo del método analítico.....	53
5.2.1.	Condiciones cromatográficas.....	54

5.2.2.	Método de extracción.	55
5.2.3.	Selectividad del método, Límite de Cuantificación y Detección.	55
5.2.4.	Preparación de la curva de calibración y puntos control en plasma.....	56
5.2.5.	Linealidad.	57
5.2.6.	Precisión del método.	58
5.2.7.	Exactitud del método.	58
5.2.8.	Recuperación absoluta (% recobro).....	59
5.2.9.	Estabilidad.....	59
5.3.	Aplicación del método analítico en un estudio piloto de biodisponibilidad.	60
5.3.1.	Análisis de las muestras plasmáticas.....	60
5.3.2.	Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos.	61
5.3.3.	Aplicación del emulgel de ivermectina al 0.5% en perros con infección por <i>Ancllostoma caninum</i> inducida.....	62
VI.	RESULTADOS y DISCUSIÓN	63
6.1.	Color, olor y apariencia de los sistemas semisólidos.....	63
6.2.	Potencial de hidrogeno (pH).	63
6.3.	Gravedad específica.....	64
6.4.	Desarrollo del método analítico.	64
6.4.1.	Condiciones del detector.....	65
6.4.2.	Columna cromatográfica.....	65
6.4.3.	Volumen de inyección, velocidad de flujo y fase móvil.	65
6.5.	Método de extracción.	69
6.6.	Resultados de validación.....	70
6.6.1.	Validación del método analítico	70
6.6.2.	Selectividad de inicio de corrida.....	70
6.6.3.	Selectividad del método y límite de cuantificación	70
6.6.4.	Linealidad del Método.....	72
6.6.5.	Precisión del método.	75
6.6.6.	Reproducibilidad y exactitud del método.	76
6.6.7.	Recobro.....	77
6.6.8.	Estabilidad.....	79
6.7.	Obtención de muestra biológica.	81
6.7.1.	Estadística descriptiva de los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo.	82

6.7.2.	Concentración plasmática promedio con respecto al tiempo (escala normal y semilogarítmica)	82
6.7.3.	Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos.....	84
VII.	CONCLUSIONES	88
VIII.	REFERENCIAS.....	89
IX.	ANEXOS	97

ABREVIATURAS

ABC_{0-t}	Área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t
ABC_{0-inf}	Área bajo la curva de concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo infinito
ACN	Acetonitrilo
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	centímetros
$C_{m\acute{a}x}$	Concentración plasmática máxima
C. V.	Coefficiente de Variación
Des. Abs.	Desviación Absoluta
D. E.	Desviación estándar
E. E	Error Estándar
g	gramos
k_{ab}	Constante de absorción
k_{el}	Constante de eliminación
mg	miligramos
μg	microgramos
MeOH	Metanol
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetros
nm	nanómetros
PNO	Procedimiento Normalizado de Operación
r	Coefficiente de regresión
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
$t_{m\acute{a}x}$	Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima
$t_{el\ 1/2}$	Vida media de eliminación
TMR	Tiempo medio de residencia
tr	Tiempo de retención
μL	microlitros

I. INTRODUCCIÓN

En la población existen un sinnúmero de enfermedades provocadas por virus, bacterias, hongos y parásitos, cabe mencionar que algunas de estas enfermedades son causadas de manera directa o indirectamente por acción de los animales denominada como zoonosis, por lo que se busca la manera de disminuir el riesgo para la población. Hoy en día, en el territorio mexicano, hay una inmensa cantidad de animales en zonas rurales y metropolitanas, que representan un riesgo de salud pública.

Este proyecto promueve el uso de ivermectina formulado en un emulgel de aplicación tópica considerado como un fármaco antiparasitario de amplio espectro, eficaz contra una gran variedad de parásitos, aprovechando un producto innovador con una mayor seguridad y confiabilidad para el consumidor y su mascota por ejemplo gato y perro, también auxiliará a los productores de carne en el país evitando la pérdida de ganancia disminuyendo infecciones parasitarias en el ganado.

En el presente trabajo se empleó un sistema de liberación transdérmica, ofreciendo ventajas en comparación a vías de administración convencionales logrando una liberación gradual y flujo controlado del principio activo, además de ser de fácil administración. Debido a que la piel siempre ha sido considerada una barrera y es un órgano dinámico complejo, dividida en capas. Se considerada una vía para lograr el ingreso de sustancias de una manera más eficaz. Mediante el diseño de un emulgel en el que se incluye la ivermectina, donde la bioadhesión y el promotor de permeación juegan un papel importante al lograr llegar a circulación sistémica e inclusive al sitio de acción, sin pasar por el tracto gastrointestinal.

En una aplicación tópica es necesario considerar el tipo de forma farmacéutica, la zona de aplicación y la dosis, optando por un emulgel o gel bioadhesivo de concentración al 0.5% (0.5 g/100 g) con una dosis de 200 µg/Kg de peso para gatos y/o perros, asimismo para la zona de aplicación se decidió por la línea dorsolumbar del animal y evitar que lo ingiera o remueva por acción mecánica.

Se cuantificó la cantidad de ivermectina que se encuentra en circulación sistémica generando un estudio de biodisponibilidad *in vivo* en seis sujetos experimentales (perros) de dos meses de edad con parasitosis, dos aplicaciones cada 24 horas en un área de exposición de 50 cm² aproximadamente, administrado como *pour-on*, eliminando parásitos exteriores e intestinales, debido a su capacidad de llegar a circulación sistémica.

En estos estudios de biodisponibilidad se determinaron parámetros farmacocinéticos, los cuales se correlacionan con los efectos terapéuticos del fármaco en el organismo, hay tres parámetros importantes: la concentración máxima (C_{max}), el tiempo para alcanzar a la concentración máxima (T_{max}) y el área bajo la curva de la concentración plasmática versus el tiempo (ABC). Estos permiten apreciar los dos factores importantes de la biodisponibilidad: la cantidad de fármaco disponible, que está relacionado con el ABC y la velocidad a la cual se hace biodisponible que está ligado con el T_{max} y C_{max} .

La vía de administración tópica durante mucho tiempo fue de acción local, pero existen pocos medicamentos que llegan a circulación sistémica y logran una acción terapéutica por completo, el uso innovador de esta forma farmacéutica transdérmica con ivermectina facilita la administración y que no sea invasivo, ocasionando dolor e incluso daño muscular al animal. Por lo tanto, esta investigación muestra la posibilidad una buena oportunidad de generar alternativas de tratamiento en animales domésticos y de granja, dada su relevancia y potencial impacto que pudiera tener en el ámbito de salud veterinaria.

II. MARCO TEÓRICO

1. Infecciones por parásitos.

Los animales domésticos se encuentran expuestos a numerosos microorganismos tales como bacterias, virus, rickettsias, mycoplasmas, clamidias, hongos y parásitos. Las parasitosis gastrointestinales son generalmente producidas por helmintos (nemátodos, céstodos) y protozoarios. Estos representan una amenaza para los animales domésticos, ya que causan anorexia, reducción en la ingestión de alimentos, pérdidas de sangre y proteínas plasmáticas en el tracto gastrointestinal, alteraciones en el metabolismo, reducción de minerales, depresión en la actividad enzimas intestinales y diarrea (Soulby E., 1987; Quiroz R., 1989).

En los animales productivos, los parásitos gastrointestinales (PGI) reducen la producción de carne, leche, huevo, lana y otros productos para el consumo y uso humano; en los animales de deporte reducen el rendimiento físico y en los animales de compañía representan un importante riesgo de transmisión de parásitos a los humanos (Acha P., 1988).

La información generada en las investigaciones, hallazgos clínicos de campo, en rastros y reportes de clínicos y de laboratorios, es de suma importancia en el diagnóstico de la situación de las principales enfermedades en los animales domésticos (Blood et al., 1988). Esta información permite tener elementos para sentar las bases para el diseño de programas de prevención, control y erradicación de las enfermedades en diferentes regiones (Thrusfield M., 1995).

En los distintos territorios el género más frecuente, es el *Ancylostoma* en las muestras de caninos (37.36%) y felinos (32.60%). Este género ha sido reportado como el parásito más frecuente en perros en otras partes del mundo y en México (Quiñonez et al., 1998). El parásito adulto de este género vive desde pocos meses hasta menos de 2 años y es probablemente el parásito más importante de los perros y gatos, ya que es un hematófago ávido, que consume aproximadamente 0.1 mL de sangre al día, además de las hemorragias que ocasiona (Anene et al., 1996; Jenkins D., Andrew P., 1993).

En México se han realizado varios estudios enfocados hacia la identificación de zoonosis por parásitos intestinales en perros de zonas urbanas y rurales, especialmente las causadas por *Ancylostoma* y *Toxocara*, ya que pueden generar en humanos síndromes de *larva migrans* cutánea y visceral, respectivamente (Quiñonez et al., 1998).

1.1. Parasitología en perros y gatos.

Los parásitos internos habituales en perros y gatos, especialmente en los animales de corta edad pueden invadir muchas zonas del cuerpo, como el tubo gastrointestinal, el corazón, los pulmones, los ojos, las vías urinarias, la piel, la musculatura e incluso el cerebro. Existen diversos tipos de parásitos internos que se pueden clasificar en función de los órganos que invaden (Figura 1).

Muchos parásitos internos tienen ciclos de vida complejos y migran por el cuerpo del animal infestado a medida que maduran. Algunas especies necesitan parasitar y madurar en otro tipo de animales distintos para multiplicarse e infestar después a perros y gatos. Los parásitos internos tienen una gran repercusión en la salud del animal, ya que pueden causar enfermedades graves, algunas de las cuales se pueden transmitir a las personas: estas enfermedades se llaman zoonosis.

La mayoría de los parásitos internos adultos son lo bastante grandes para ser perceptibles a simple vista, pero también pueden permanecer ocultos en el cuerpo del animal cuando invaden un órgano interno.

En el caso de los parásitos internos del intestino, en ocasiones es posible ver los gusanos en las heces. Sin embargo, los huevos son microscópicos y no es posible detectarlos a simple vista; a menudo, están presentes en las heces, listos para infectar a otro animal (Gutiérrez J., 2006).

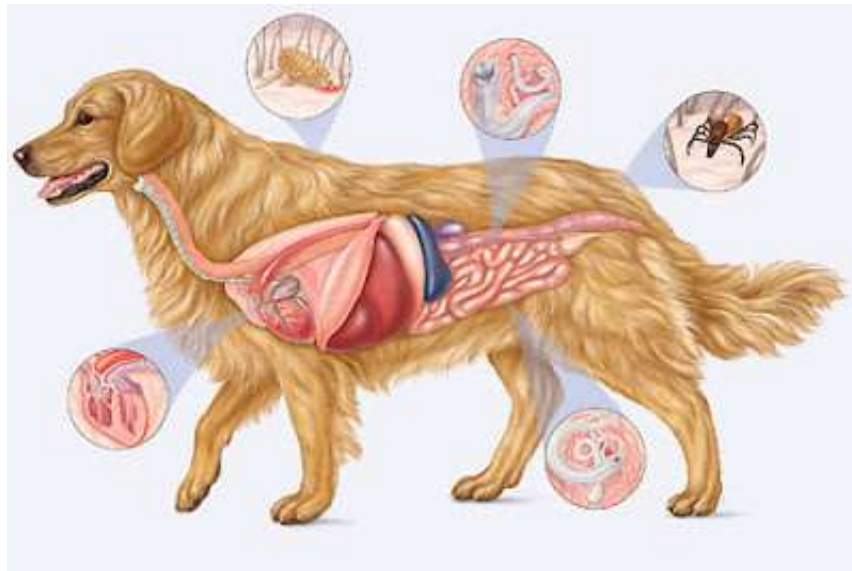


Figura 1. Parasito Internos y Externos.

1.1.1. Clasificación de parásitos por órgano.

1.1.1.1. Parásitos intestinales.

Según Fisher M. y Macgarry J. (2007), los cachorros y los gatos se infectan a través de la leche materna o durante la gestación, y todos los animales de compañía pueden resultar infestados a partir del suelo o el pelaje contaminados con heces de hospedadores infestados con el parásito adulto, los autores mencionan la siguiente clasificación:

a. Los vermes redondos se pueden también transmitir a las personas, sobre todo a los niños. Las infecciones por vermes redondos son una zoonosis de gran importancia, ya que pueden provocar una enfermedad grave, especialmente en los niños, sobre todo si las larvas migran a los ojos (*larva migrans ocular*), donde pueden causar ceguera, o a las vísceras (*larva migrans visceralis*). Por esta razón, es esencial ocuparse de prevenir la infestación por estos parásitos mediante la administración periódica de antiparasitarios, y hacerlo siempre con el asesoramiento de su veterinario.

b. Los anquilostomas son gusanos pequeños y delgados que no alcanzan 1,5 cm de longitud y que tienen forma de gancho. Pueden infectar a perros y gatos. Viven en el intestino del animal, donde se alimentan de sangre. A diferencia de los vermes redondos, los anquilostomas también pueden atravesar la piel y se pueden transmitir a las personas. En el ser humano, las larvas pueden migrar a la piel, donde provocan lesiones cutáneas moderadamente inflamadas y generalmente elevadas (erupciones serpiginosas), así como enteritis eosinofílica (una enfermedad digestiva).

c. Los *Trichuris* son gusanos mucho más pequeños que tienen forma de látigo, frecuentes sobre todo en los perros, donde parasitan el intestino grueso. La *Tenia* son parásitos intestinales de gran importancia, por el hecho de ser bastante habituales y por poder transmitirse al ser humano con consecuencias más o menos graves. Varias especies pueden parasitar a perros y gatos, entre ellas *Echinococcus spp.*, *Dipylidium caninum* y *Taenia spp.* Los adultos poseen una cabeza con la que se anclan a la pared intestinal, mientras que su cuerpo plano queda suspendido entre los alimentos digeridos. El cuerpo de estos gusanos está dividido en segmentos y puede ser muy pequeños o alcanzar hasta 2 m de longitud. Los gatos, y especialmente los perros, pueden resultar infectados por comer carne cruda (*E. granulosus*), cazar roedores (*E. multilocularis*) o ingerir pulgas durante el acicalamiento (*Dipylidium caninum*).

La especie *Echinococcus* es la más temida, debido al riesgo de contagio a las personas, en las que puede ocasionar graves consecuencias. En las personas estos gusanos pueden

provocar equinococosis alveolar y quística (invasión de los parásitos en el hígado y los pulmones), que requiere tratamiento farmacológico y quirúrgico. La equinococosis es una zoonosis importante cuya prevención requiere la aplicación de medidas higiénicas y la desparasitación periódica de las mascotas. (Heymann, D. 2005)

Otros parásitos intestinales de tamaño microscópico, como *Giardia* o *Tritrichomonas*, también pueden infectar a perros y gatos, y pueden asimismo transmitirse a las personas.

1.1.1.2. Parásitos del corazón y vermes pulmonares.

Estos gusanos redondos pasan su vida adulta en el corazón y los pulmones de los perros y gatos. Los gusanos del corazón y los vermes pulmonares provocan lesiones de diversa consideración en los vasos sanguíneos del corazón y los pulmones cuando migran por el cuerpo.

Los gatos y los perros que presentan dirofilariosis pueden no presentar síntoma alguno, pero pueden manifestar una serie de síntomas relacionados con disfunciones pulmonares, cardíacas, hepáticas o renales, según en qué fase se encuentre la infección (Martínez L., 2003). La Dirofilariosis (*Dirofilaria immitis*) es la más importante de las enfermedades causadas por este tipo de parásitos y está presente en muchos países. La dirofilaria es transmitida por varias especies de mosquitos, queda limitada a zonas ribereñas. Sin embargo, el calentamiento global está favoreciendo la expansión del parásito hacia zonas más septentrionales (Muñoz L., 2003).

La estrogiloidosis este tipo de parásitos tiene un estadio intermedio que vive en las babosas y en los caracoles, e infectan al perro o al gato cuando éstos los devoran. Una vez en el cuerpo del animal, pueden invadir los órganos internos, sobre todo los pulmones (Martínez L., 2003).

1.1.2. Vías de infección de parásitos.

Los huéspedes pueden infectarse por penetración transcutánea o por vía oral, en el último caso por ingestión de leche de madres infectadas o consumo de huéspedes paraténicos, el esquema de las vías de infección se representa en la Figura 2.

La infestación puede llevarse a cabo por cuatro vías;

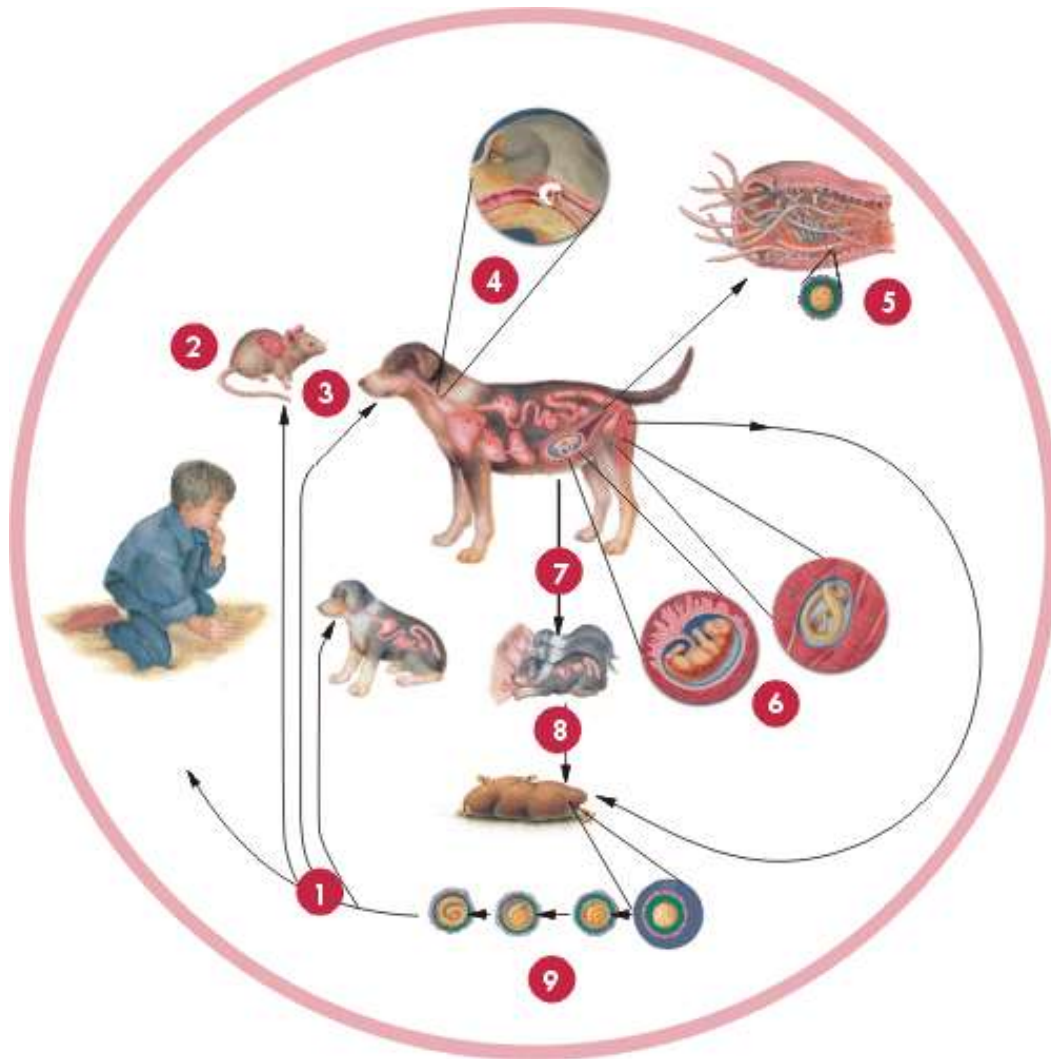


Figura 2 Representación esquemática de infección por parásitos.

En la infestación cutánea, las larvas infectantes localizan el huésped atraídas por la temperatura y por sustancias químicas, penetran por la piel mediante fenómenos mecánicos y enzimáticos, probablemente con la ayuda de una hialuronidasa, y llegan al pulmón llevadas por el flujo sanguíneo. Una vez allí, rompen las paredes de los capilares y de los alvéolos, reptan por el árbol respiratorio para llegar a la faringe, mudan al cuarto estadio entre 44 y 48 horas después de la infección y son deglutidas. Las larvas se transforman en nemátodos juveniles en el intestino delgado antes del sexto día de la infección. Subsecuentemente, llegan a la madurez y las hembras inician la oviposición a partir de los 14 días de la infección (González J., 2015).

En las infestaciones orales, unas pocas larvas pueden penetrar la mucosa digestiva y seguir un ciclo sistémico como el de la infección transcutánea, pero la mayoría penetra en la mucosa gástrica o intestinal y madura allí sin abandonar el tracto gastrointestinal. El hallazgo de ancilostómidos adultos en recién nacidos (humanos) sugiere la posibilidad de transmisión perinatal, ya sea uterina o por lactancia. La persistencia de larvas infectantes de ancilostómidos por días o meses en roedores, conejos o pollos como hospederos, sugiere que en el hombre puede ocurrir la transmisión por huéspedes paraténicos (González J., 2015).

En la infestación prenatal de fetos por vía intrauterina, tratándose de perras gestantes, las larvas pueden llegar a los fetos, infestándolos prenatalmente. Las larvas permanecen latentes en el hígado hasta que los cachorros nacen, en cuyo momento tiene lugar la parte pulmonar de la migración, llegando al intestino y alcanzando su madurez mientras los cachorros son aún muy jóvenes (González J., 2015).

En la infestación calostrual o lacto génica de las crías por el paso de las larvas mediante la leche a cachorros lactantes, las larvas que están en las glándulas mamarias penetran en las cisternas lácteas, desde donde pasan con el calostro y la leche de los cachorros, en un periodo de 3 semanas, al cabo de cuyo plazo ya no quedan más larvas (González J., 2015).

1.1.2.1. Parasitosis en el hombre.

Los signos más importantes de la parásitosis no zoonótica son la anemia causada por un péptido anticoagulante que inhibe el factor de la coagulación Xa y la atrofia de las vellosidades intestinales. Estos signos no se observan en la parásitosis zoonótica debido a la escasa carga parasitaria en el hombre. La infección humana probablemente es asintomática en una larga proporción de los enfermos, pero en algunos casos produce enteritis eosinofílica. La manifestación clínica más notoria es el dolor abdominal, a veces muy intenso, con o sin eosinofilia sanguínea. Las lesiones asociadas con la infección son una inflamación eosinofílica focal o difusa, probablemente por reacción a antígenos del parásito, y úlceras aftosas del íleon terminal, ciego o colon, observadas por endoscopia. Las manifestaciones clínicas y la patología de esta infección son similares a las de la anisakirosis (Organización Panamericana de la Salud, 2003).

1.1.2.2. Parasitosis en los animales.

Los perros se afectan de un modo más severo que los gatos. Los animales más jóvenes pueden tener pérdidas de sangre o anemias ferropénicas que ponen en peligro su vida,

melena, sangre fresca en las heces, diarrea y/o retraso en el crecimiento. Los parásitos por sí solos raramente dan lugar a un cuadro clínico en animales mayores, salvo en parasitaciones masivas. Estos parásitos pueden contribuir a agravar una enfermedad causada por otros problemas intestinales (Nelson R. y Couta G., 2010).

La parasitosis animal puede manifestarse en forma clínica en la piel por la entrada de los parásitos, en los pulmones por la migración de las larvas o en el intestino por la actividad de los adultos. La intensidad de la infección depende de varios factores, tales como el número de parásitos, el estado nutricional del animal, la edad o infecciones previas con estos nemátodos. Los animales jóvenes son los más afectados (Organización Panamericana de la Salud, 2003).

1.2. Diagnóstico.

1.2.1. Animales.

La detección de huevos en las heces es diagnosticada. Sin embargo, cachorros de 5 a 10 días de edad pueden tener pérdidas de sangre por una parasitación transmitida a través del calostro antes de que aparezcan huevos en las heces. El diagnóstico es sospechoso en estos pacientes por su historia y signos clínicos. En cachorros con anemia ferropénica sin pulgas, se debe sospechar de parasitación por ancilostómidos.

1.2.2. Humanos.

La infección no se puede diagnosticar por la presencia de huevos en las heces debido a que el nematodo no alcanza la madurez en el hombre. La observación de úlceras aftosas del íleon terminal, ciego o colon, asociadas con las manifestaciones clínicas, ayudan al diagnóstico. Los ensayos de inmunosorción enzimática (ELISA) con productos secretorios y excretorios del parásito han demostrado anticuerpos específicos de las clases IgG e IgE. La prueba de inmunoelectrotransferencia (Western-Blot) con un antígeno de 68kDa aparentemente es más sensible y específica (Nelson R. y Couta G., 2010).

1.3. Tratamiento.

El tratamiento tiene una respuesta bastante satisfactoria con los fármacos como pamoato de pirantel, mebendazol, ácido kaníco, albendazol, nitazoxanida y endotocidas (Ivermectina), en las dosis adecuadas. (Romero R., 2007)

1.3.1. Endectocidas (lactonas macrocíclicas).

1.3.1.1. Características generales.

Son las llamadas lactonas macrocíclicas (Meeus et al. 1997). Actúan sobre parásitos internos y externos con dosis bajas, es decir, son parasiticidas de amplio espectro que actúan sobre moscas (*Haematobia irritans*), larvas de mosca (*Dermatobia hominis*) garrapatas de diferentes géneros y especies, piojos, ácaros de la sarna, además de controlar parásitos internos como gastroentéricos (*Haemonchus*, *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Cooperia*, *Nematodirus*, etc.), parásitos pulmonares (*Dictyocaulus viviparus*) (Lanusse et al., 1994). Este amplio espectro ha dado lugar a que las lactonas macrocíclicas sean catalogadas como endectocidas.

Tienen la ventaja de tener un poder residual más largo que otros quimioterapéuticos para el control de los parásitos, además de presentar diversas formas de aplicación (inyectable, tópica o *pour-on* y la administración de bolos) (Lanusse C., 1994)).

1.3.1.2. Clasificación.

Las lactonas macrocíclicas se dividen en dos subgrupos:

a) Avermectinas: las cuales incluyen la abamectina, doramectina, ivermectina, emamectina, eprinomectina y selamectina (Figura 3). Tienen un sustituyente sacárido en la posición C13. Estos compuestos naturales se generan como productos de la fermentación de *Streptomyces avermitilis*, un actinomiceto del suelo. Estudios electrofisiológicos, han demostrado que se les asocia con el bloqueo del canal glutamato cloro – glutamato en nemátodos y artrópodos (Rathbone M- y Gurny R., 2000).

b) Mibelmicinas: también llamadas nemodectinas; la moxidectina (Figura 3) es la más representativa. No presenta un sustituyente sacárido. Son originadas por *S.cyanogrise* o *S. hygroscopicus* (Lanusse et al., 1994).

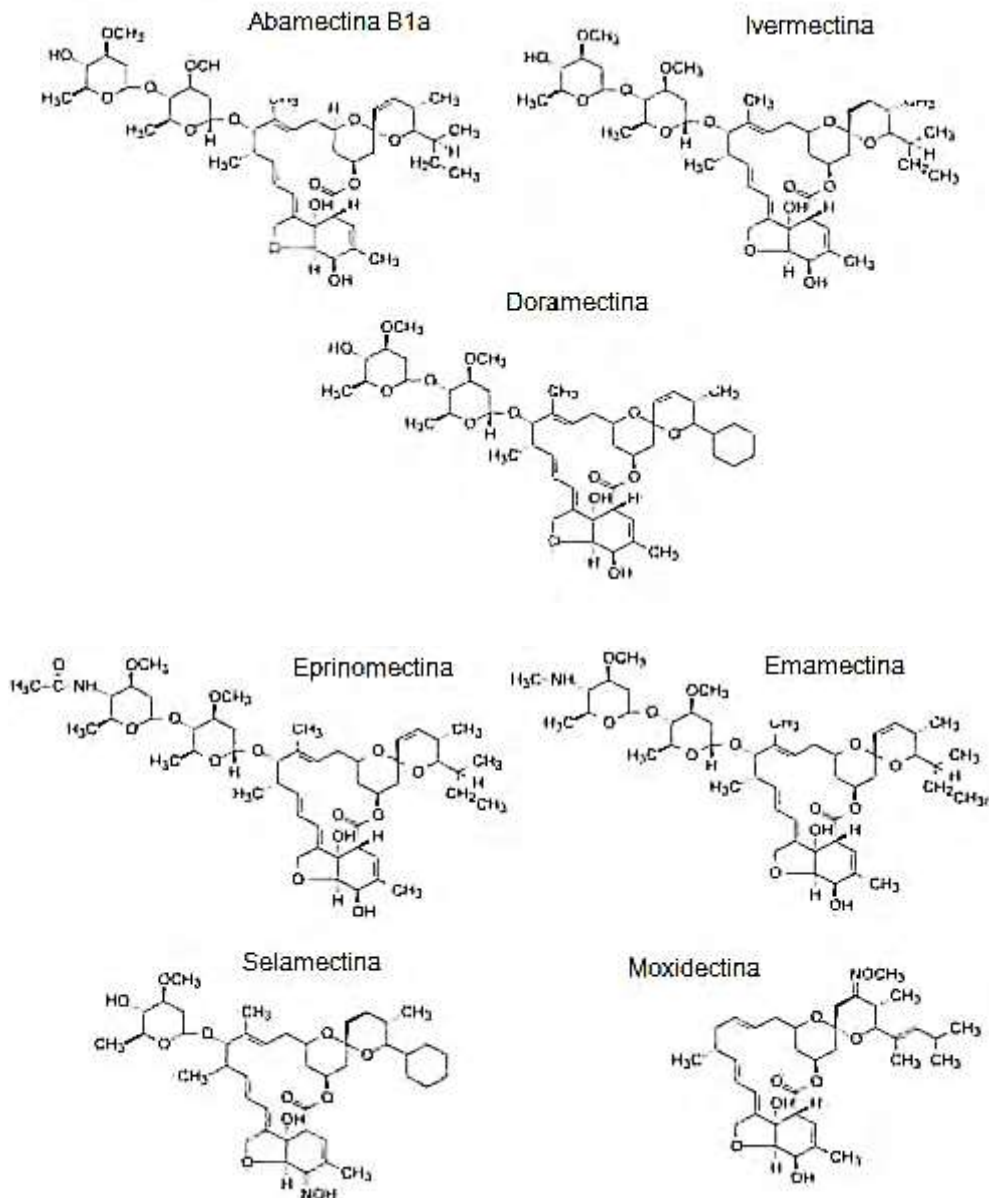


Figura 3. Estructuras de las principales lactonas macrocíclicas.
(Rathbone M- y Gurny R., 2000)

1.3.2. Ivermectina.

1.3.2.1. Características de la ivermectina.

La ivermectina (IVM) es una lactona macrocíclica semisintética. Es una forma modificada de un compuesto macrocíclico llamado avermectina derivado del hongo *Streptomyces avermitilis*. Está conformada por la mezcla de dos compuestos que son: dihidroavermectina B1a (90%) y la dihidroavermectina B1b (10%) (Pitterna et al., 2009). Presenta una

estructura similar a los antibióticos macrólidos, pero carece de actividad antibacteriana. Sin embargo, es muy activa contra una amplia variedad de parásitos que infectan animales y al humano, incluyendo nemátodos, ácaros e insectos en los que inhibe el neurotransmisor ácido gamma aminobutírico provocando parálisis flácida, por lo que tienen propiedades antihelmínticas (Shoop et al., 1995).

Los productos de fermentación del actinomiceto *Streptomyces avermitilis* corresponden a cuatro pares de compuestos homólogos relacionados, de los cuales la avermectina B1a es el más importante ya que se produce en mayor cantidad y del cual se ha obtenido el derivado semisintético ivermectina (Pitterna et al., 2009). La ivermectina posee un amplio espectro de actividad contra estados adultos y larvarios de nemátodos y artrópodos parásitos en los animales domésticos y su modo de acción la hacen completamente activa contra parásitos resistentes a otros antihelmínticos. (Scott E. y McKeller Q., 1992)

1.3.2.2. Propiedades Fisicoquímicas.

La ivermectina presenta las siguientes propiedades fisicoquímicas:

- a) Polvo blanco o amarillo cristalino, insoluble en agua, pero soluble en metanol y etanol al 95% (Scott E. y McKeller Q., 1992).
- b) Es estable en su forma sólida por 6 meses a 40°C.
- c) Peso molecular: B1a, B1b es de 875.1 Da, 861.1 Da, respectivamente
- d) Solubilidad en alcohol: 1 en 10 300 partes.
- e) Solubilidad en agua: 1 en 1 000 000 partes.
- f) Coeficiente de partición octanol / agua (logP) 5.83.
- g) Punto de fusión: 155°C.
- h) Estructura química (Figura 3).
- i) Fórmula química: $C_{48}H_{74}O_{14}$ (90%) / $C_{47}H_{72}O_{14}$ (10%). Nombre Químico: 22,23-Dihidroavermectina B1a (90%), 22,23-Dihidroavermectina B1b (10%)

1.3.2.3. Propiedades Farmacológicas.

1.3.2.3.1. Mecanismo de Acción.

Originalmente se pensaba que los endectocidas macrólidos aumentaban la liberación de ácido gamma-amino butírico (GABA) desde los sinaptosomas del sistema nervioso lo que a su vez permitía la activación de los canales de cloruro, como se ilustra en la Figura 4. (Shoop et al., 1995).

En la actualidad se sabe que, en los invertebrados, estos compuestos activan los canales de cloruro activados por glutamato por medio de un sitio de unión específico (Shoop et al., 1995; Roder, R., 2001) y que afectan la motilidad y el bombeo faríngeo en los nemátodos parásitos. El mecanismo de acción de las avermectinas es la parálisis selectiva del parásito por aumento de la permeabilidad muscular a los iones cloruro. A bajas concentraciones las avermectinas potencian los efectos del glutamato, y a altas concentraciones abren directamente los canales activados por glutamato (Omura, S., 2007). El medicamento tiene pocos efectos en parásitos adultos, pero afecta a las larvas en desarrollo y bloquea la salida de microfilarias del útero de los vermes adultos.

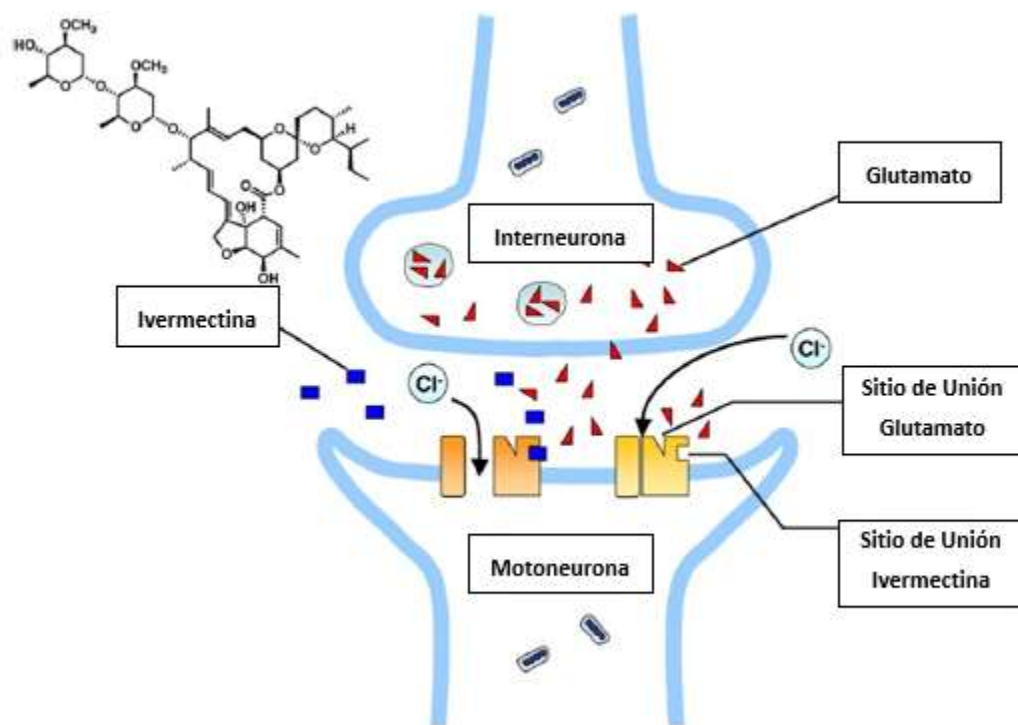


Figura 4. La ivermectina se une a los canales de cloro regulados por glutamato y por el GABA en la membrana celular de las células nerviosa y muscular, la hiperpolariza y causa parálisis y muerte por inanición del parásito. (Omura, S., 2007)

Toxicidad selectiva. El efecto terapéutico selectivo de las avermectinas se puede explicar por una acción sobre los canales glutamato-cloruro que están presentes en los nemátodos parásitos y no en el huésped animal, (Roder, R., 2001) lo que sumado al hecho de que en mamíferos la neurotransmisión mediada por GABA está limitada al sistema nervioso central, y debido a que los macrólidos endectocidas no atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica, explican el hecho que estos antihelmínticos tengan un amplio margen de seguridad (Scott E. y McKeller Q., 1992).

Los signos clínicos observados en caso de toxicidad con ivermectina corresponden a midriasis, depresión, temblor, ataxia, estupor, emesis e hipersalivación, siendo los más comunes la ataxia y depresión, los que suelen presentarse con dosis veinte a cuarenta veces la dosis terapéutica en el caso de bovinos y diez veces en el caso de equinos y porcinos. (Roder, R., 2001)

Espectro de actividad. La actividad antihelmíntica del fármaco sobre el parásito está relacionada con la presencia de concentraciones afectivas en el sitio de acción, en términos de nivel y duración (Baggot JD. y McKeller Q., 1994).

Las lactonas macrocíclicas se caracterizan por poseer un persistente efecto antihelmíntico (Meeus et al. 1997) contra nemátodos gastrointestinales en rumiantes y por su potente actividad antiparasitaria a muy bajas dosis contra nemátodos y ectoparásitos patógenos de animales domésticos (Gokbulut et al., 2001). Dentro de estas, la ivermectina posee un amplio espectro de actividad contra muchos ectoparásitos de animales domésticos.

1.3.2.4. Propiedades farmacocinéticas.

La farmacocinética se relaciona con el estudio y caracterización en el tiempo de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de los fármacos. Para optimizar el uso clínico de los fármacos antihelmínticos es necesario la comprensión del comportamiento farmacocinético, la tasa de biodisponibilidad y su impacto sobre el efecto farmacológico de los mismos (Lanusse C., 1994).

Las diferencias en las propiedades fisicoquímicas entre los diferentes endectocidas puede explicar la flexibilidad de las formulaciones, conducta cinética, además de la potencia y persistencia de su actividad antiparasitaria. Está claro que aun pequeñas modificaciones en la disposición cinética y/o el patrón de intercambio plasmático/tisular, pueden afectar notablemente la persistencia del efecto antiparasitario de las diferentes avermectinas y mibemicinas, (Lanusse et al., 1994) por lo que su eficacia clínica está estrechamente relacionada a su conducta farmacocinética (Sallovitz et al., 2002).

La baja solubilidad de ivermectina en agua, sus formulaciones en preparaciones no acuosas y su deposición en el tejido subcutáneo favorecen una baja absorción desde el sitio de inyección, lo que puede explicar su prolongada persistencia en el organismo de los animales tratados (Lanusse et al., 1994).

Diversos estudios farmacocinéticos en antihelmínticos se han realizado en animales no parasitados (McKeller et al., 1991), en circunstancias que el parasitismo puede alterar la disponibilidad sistémica, la disposición cinética y el destino de los fármacos antihelmínticos. Es así como el parasitismo gastrointestinal puede afectar la absorción y por lo tanto la disponibilidad y eficacia de antihelmínticos administrados por vía oral, mientras que el parasitismo hepático puede afectar su metabolismo (Baggot JD. y McKeller Q., 1994).

1.3.2.4.1. Formulaciones y vías de administración.

La farmacocinética y actividad de las avermectinas y milbemicinas se ven particularmente influenciadas por las propiedades fisicoquímicas de las moléculas activas (Gokbulut et al., 2001). Se sabe que el excipiente influye significativamente en la velocidad y duración del proceso de absorción del fármaco y puede modificar el perfil de concentración plasmática (Sallovitz et al., 2002).

La ruta de administración de los fármacos antihelmínticos puede afectar su distribución, la biodisponibilidad y persistencia de sus concentraciones en el organismo. La ivermectina es un fármaco altamente lipofílico que es absorbido adecuadamente cuando se administra ya sea por vía parenteral, tópica u oral, distribuyéndose ampliamente en el organismo. Se concentra en el tejido adiposo desde donde es liberada lentamente para posteriormente una fracción de ella ser transformada en metabolitos menos liposolubles (Baggot JD. y McKeller Q., 1994).

1.3.2.4.2. Distribución.

Debido a su alta lipofilidad, la ivermectina tiene un gran volumen de distribución y un prolongado tiempo de resistencia, (Roder, R., 2001) existiendo variaciones individuales en su biodisponibilidad, las que pueden deberse a diferencias en la absorción desde el sitio de administración, la condición corporal, el contenido de grasa, además de las posibles diferencias de especie en el metabolismo y eliminación del fármaco.

1.3.2.4.3. Metabolismo y excreción.

La ivermectina es absorbida rápidamente hacia el torrente sanguíneo después de la administración oral o parenteral y es excretada a través de las heces en un 90% como fármaco intacto en los animales tratados, siendo el 2-3% excretado en la orina (Campbell W. C., 1993).

La administración subcutánea de ivermectina prolonga el tiempo de residencia en el plasma y la persistencia de residuos de fármaco en los tejidos, principalmente en hígado y tejido graso. Sus metabolitos son principalmente excretados a través de la bilis, lo que, sumado a la fijación a las partículas en digestión durante el tránsito intestinal, prolonga sustancialmente la aparición de residuos en las heces en comparación a la administración oral (Pérez et al., 2001). Por tanto, la duración de la excreción depende de la formulación, la vía de administración (Toutain et al., 1997), la producción de materia fecal, las propiedades fisicoquímicas del fármaco y la fisiología digestiva en el caso de formulaciones que se administren por vía oral (Pérez et al., 2001).

1.4. Farmacocinética.

1.4.1. Conceptos generales de farmacocinética.

La actividad terapéutica de un medicamento está determinada por una serie de fenómenos dependientes del sujeto que recibe la medicación y del principio activo administrado. Los fenómenos críticos que la definen se han organizado secuencialmente en las fases biofarmacéutico, farmacocinética y farmacodinámica según se trate del aspecto farmacotécnico de la formulación, de lo que el organismo le produce al fármaco o bien de la situación inversa, respectivamente.

La base biofarmacéutica está determinada por el conjunto de fenómenos comprendidos entre la administración del medicamento y la absorción del principio activo; estudia los fenómenos que determinan la disponibilidad del principio activo por el organismo desde la forma farmacéutica administrada. A partir de la administración de un medicamento, el individuo recibe una dosis del fármaco incluida en una forma farmacéutica de la cual debe liberarse. La liberación queda determinada por la tecnología farmacéutica empleada en la elaboración en la forma farmacéutica y por el medio biológico en el cual se disgrega y disuelve la formulación. Luego, de manera progresiva, se disuelve el principio activo lo que permite su absorción dando comienzo la fase farmacocinética (Bruton L. 1996).

La farmacocinética estudia los cambios que sufre el principio activo *in vivo*, implica el estudio de la evolución temporal de las cantidades de fármacos y sus metabolitos en tejidos o fluidos biológicos, empleando modelos matemáticos que permiten interpretar los resultados obtenidos. Una clara definición fue postulada por Gibaldi y Levy en 1976 en la cual mencionan que "La farmacocinética está relacionada con el estudio y caracterización en el transcurso del tiempo de la absorción, distribución, metabolismo y excreción de un

fármaco y la relación de esos procesos con la intensidad y la evolución temporal de los efectos terapéuticos y adversos del fármaco. Se aplican técnicas matemáticas y bioquímicas como herramientas del estudio” esto se ve representado en la Figura No.5 (Rang et al., 2003).

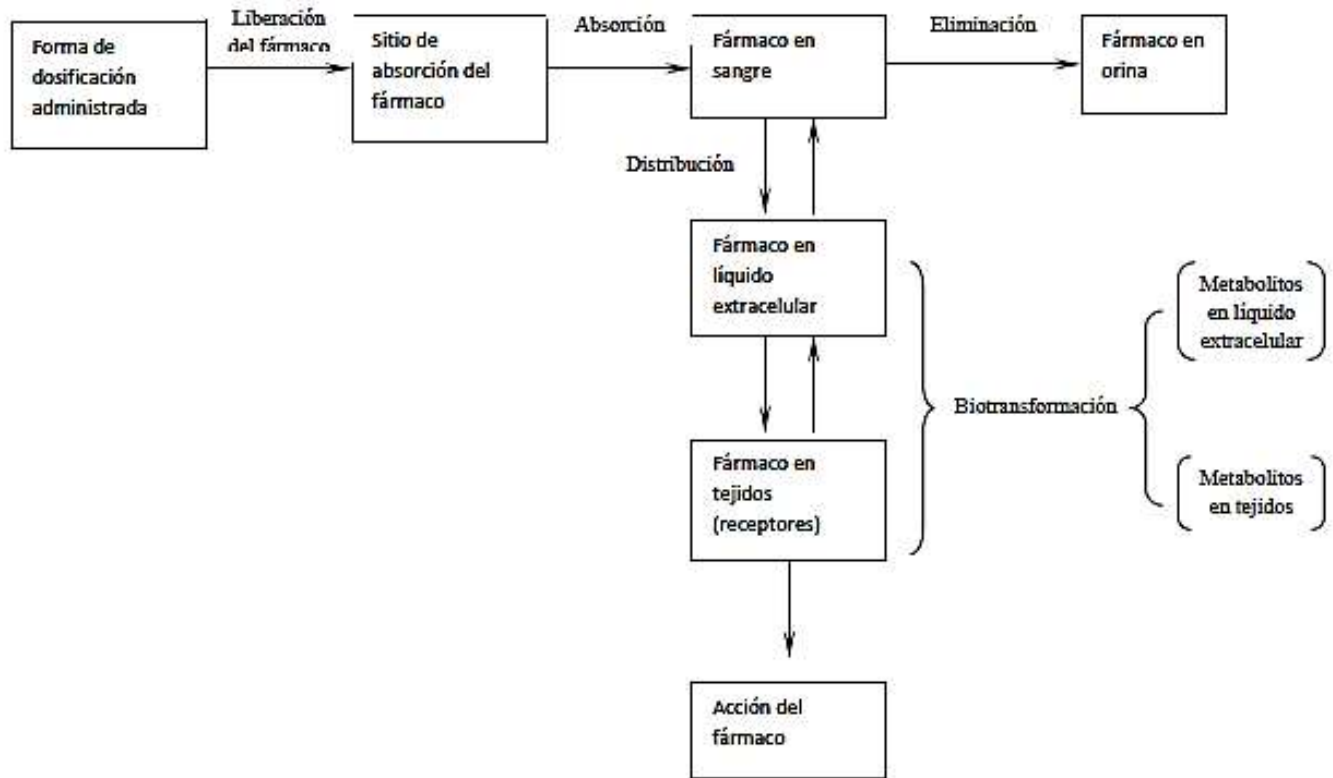


Figura 5. Representación esquemática de la Liberación, Absorción, Distribución, Biotransformación y Eliminación de los fármacos. Proceso LADBE (Rang et al., 2003)

1.4.1.1. Absorción.

Según los mencionado por Ritschel W. y Kearns G. (2009), la absorción se define como el paso del fármaco desde el sitio de administración hacia el plasma, por lo que es importante para todas las rutas de administración excepto para la intravenosa. Para fármacos que son administrados por vía oral, la absorción puede ser un factor determinante para la biodisponibilidad, pues puede alterar la entrada del fármaco al organismo. La absorción generalmente se lleva a cabo en el intestino delgado, ya que la disposición de éste lo hace apto para este proceso, pues el área superficial disponible para la absorción es muy alta gracias a las microvellosidades. Existen diversos tipos de transporte que permiten la entrada de los agentes xenobióticos al organismo: la difusión pasiva es una forma de transporte a través del cual los solutos pueden atravesar la bicapa lipídica de las membranas sin la necesidad de energía; para que se lleve a cabo este proceso es necesario

que exista un gradiente de concentración del soluto. Otro tipo de transporte involucra la participación de proteínas transportadoras o acarreadores que pueden unirse a una o más moléculas o iones y al cambiar de conformación, estas proteínas pueden liberar los solutos hacia el otro lado de la membrana. Este sistema puede operar de forma pasiva (sin la necesidad de energía), y se conoce como difusión facilitada, o puede estar acoplado a un gradiente electroquímico de Na^+ y requerir energía por lo que puede ir en contra de un gradiente de concentración; en este caso el transporte es conocido como transporte activo.

1.4.1.2. Distribución.

Una vez absorbido, un fármaco tiene que ser transportado en el organismo para alcanzar el sitio de acción; este proceso se conoce como distribución. Con respecto a este proceso farmacocinético, es necesario mencionar que para que un compuesto sea farmacológicamente activo, debe encontrarse en su forma libre; sin embargo, hay fármacos que se unen de forma reversible a proteínas plasmáticas, principalmente a albúmina, y de esta manera pueden ser transportados en el organismo. La cantidad de fármaco unido a las proteínas depende de tres factores: la concentración de fármaco libre, su afinidad con los sitios de unión y la concentración de la proteína (Lorenzo, P., et al. 2004).

1.4.1.3. Biotransformación.

Para un gran número de fármacos, su eficiencia, permanencia en el organismo y la duración de sus efectos depende de su biotransformación. Los factores genéticos y ambientales contribuyen a un gran número de variaciones inter e intraindividuales en este proceso. La actividad de las enzimas encargadas del metabolismo de los fármacos puede influir en la intensidad y duración de la acción de los mismos. (Lorenzo, P., et al. 2004).

1.4.1.4. Excreción.

La depuración de los fármacos se lleva a cabo principalmente a través del hígado y los riñones. La excreción de los metabolitos y del fármaco inalterado en la orina constituye la principal ruta de eliminación. La depuración a su vez depende de la cantidad de fármaco liberado al órgano de excreción y el grado en el que es extraído de la sangre para ser excretado. De esta manera, al aumentar la cantidad de fármaco libre aumentará la velocidad de excreción.

Finalmente, la fase farmacodinámica involucra el mecanismo de acción de los principios activos por el que se obtiene una respuesta farmacológica. Para cada fármaco en particular, puede hallarse una relación temporal entre la cantidad de principio activo en la biofase y la

intensidad y duración de la actividad terapéutica. Esta relación, conocida como relación Farmacocinética Farmacodinámica o PK-PD, se describe mediante una función matemática característica, que permite relacionar las concentraciones de fármaco en la biofase con el efecto terapéutico a lo largo del tiempo. En general la biofase es un sitio de difícil acceso por lo cual, para facilitar los cálculos se relaciona la concentración del compuesto estudiado en la biofase con la de un fluido de mejor acceso como la sangre, la bilis o la orina. En los casos en que la biofase se encuentre en tejidos altamente irrigados, existirá un equilibrio certero entre las concentraciones de fármaco en la biofase y el plasma (Lorenzo, P., et al. 2004).

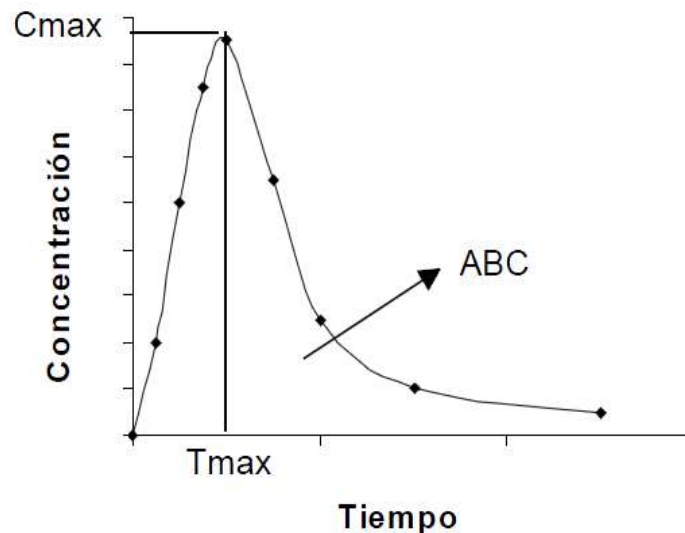
El objetivo perseguido cuando se busca una relación PK-PD es calcular, a partir de las concentraciones plasmáticas del fármaco, la dosis del fármaco necesarias que produzca el efecto terapéutico, o bien potencialmente tóxica. Otra aproximación posible consiste en utilizar los valores del efecto farmacológico obtenido *in vitro*.

En general, la cinética de un fármaco en un sistema biológico se describe mediante parámetros cinéticos. En la práctica, los parámetros farmacocinéticos se obtienen de manera experimental a partir de los datos. Los datos son el conjunto de valores de concentración de fármaco (variable dependiente) y del tiempo de obtención de cada muestra (variable independiente). A partir de los datos, se trabaja con algoritmos matemáticos que relacionan los parámetros cinéticos entre sí y permiten la descripción del sistema en estudio (hipótesis modelo independiente). Otra forma de cálculo de los parámetros cinéticos consiste en formular una hipótesis mediante modelos compartimentales, con base a un sistema de ecuaciones matemáticas que permitan la cuantificación e interpretación de los procesos de absorción, distribución y eliminación que sufre el fármaco en el organismo. Estos modelos describen los cambios temporales de las concentraciones del fármaco en los fluidos biológicos y permiten la descripción de su cinética mediante el cálculo de una serie de parámetros farmacocinéticos (Winter, M. 1994).

Independientemente de las ecuaciones matemáticas empleadas para aproximar el sistema, el primer paso en el análisis cinético es graficar los valores de concentración del compuesto analizado en función del tiempo de su recolección. El gráfico obtenido consiste de una serie de puntos discretos que pueden aproximarse a una curva.

Cuando la ruta de administración es la vía extravascular, el perfil plasmático mostrará un aumento progresivo alcanzando una concentración máxima (C_{max}). Este máximo de concentración se produce a un tiempo identificado como T_{max}.

Los valores de C_{max} y T_{max} son parámetros característicos de cada curva. Ambos valores se relacionan con la velocidad con la que un fármaco alcanza la biofase o sitio efector mientras que C_{max} también se vincula con la cantidad que llega a dicho sitio, representada en la Figura 6.



**Figura 6. Perfil Plasmático de administración extravascular.
(Ritschel W. y Kearns G. 2009)**

El área debajo de la curva determinada por la concentración del analito en función del tiempo, se abrevia ABC y se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$ABC = \int C_p dt$$

El cálculo de la integral se puede aproximar a una sumatoria de trapecios, estableciendo los límites de integración en función de la porción del área total a calcular.

1.4.1.5. Modelos Compartimentales.

Aguilar, A. y colaboradores (2008) explica que los modelos compartimentales consideran al organismo como un conjunto de sistemas o compartimentos comunicados entre sí. Cada compartimento no tiene un significado fisiológico o una correspondencia con una región anatómica real, sino que representa un tejido o un grupo de ellos que muestran similares flujo sanguíneo y afinidad por el fármaco en estudio. Entonces, se habla de compartimentos cinéticos. Al ingresar el fármaco al compartimento se considera que el proceso de mezclado

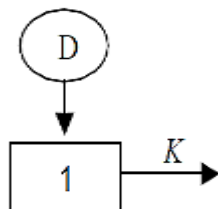
se produce instantánea y uniformemente en todo el compartimento. Por ende, la concentración de fármaco presente en la muestra biológica recogida representa un promedio de la concentración de fármaco en el compartimento.

En el caso de la hipótesis compartimental, existe una entrada de fármaco al compartimento y la consecuente salida, ya sea hacia otros compartimentos que forman parte del organismo o hacia el exterior, por lo que se considera al modelo un sistema abierto. Los movimientos del fármaco en el organismo se cuantifican a través de las constantes de velocidad respectivas.

El modelo compartimental más utilizado es el mamilar. Este consiste en un compartimento central que representa el plasma y los tejidos altamente irrigados en los cuales el fármaco se equilibra rápidamente, interconectado con uno o más compartimentos periféricos.

Dependiendo del número de compartimentos se denomina modelo monocompartimental, bicompartimental, tricompartmental y así sucesivamente. En general, se utiliza un gráfico de cajas interconectadas para representar el tipo de modelo elegido para el ajuste de los datos experimentales (Figura 7). Por ejemplo, considerando un modelo abierto monocompartimental, el fármaco administrado por vía intravenosa ingresa directamente al compartimento central y se distribuye instantáneamente entre la sangre y los tejidos. La eliminación se produce a partir del compartimento central ya que los órganos de eliminación, hígado y riñones, se consideran parte del compartimento central (Gibaldi, M. y Perrier, D. 2006).

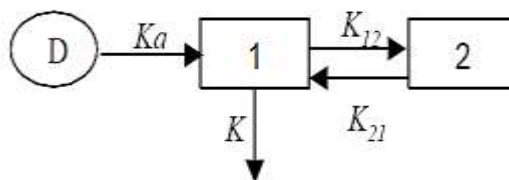
Modelo abierto monocompartimental con administración parenteral



Modelo abierto monocompartimental con absorción de primer orden



Modelo abierto bicompartimental con administración parenteral



Modelo abierto bicompartimental con absorción de primer orden

Figura 7. Representación gráfica de los modelos compartimentales de menor complejidad. D = dosis; K_a = constante de velocidad de absorción; K_{12} , K_{21} = microconstantes; K = constante de velocidad de eliminación.
(Ritschel W. y Kearns G. 2009)

En realidad, el organismo humano está constituido por millones de compartimientos, si se considera la concentración del fármaco a nivel tisular y celular. Sin embargo, los únicos fluidos biológicos accesibles y válidos para la cuantificación de un fármaco son la sangre, la orina y en algunas ocasiones la saliva. Por lo tanto, el diseño de modelos compartimentales se basa en ajustar los datos de los niveles en sangre (plasma o suero) en función del tiempo o la cantidad de fármaco acumulado excretado en orina en función del tiempo de recolección de muestras.

En general, al analizar el comportamiento de un fármaco en un sistema biológico se comienza por verificar si los datos experimentales pueden ajustarse al modelo más sencillo, el monocompartimental. Si el ajuste no es bueno, se continúa con modelos más sofisticados. Lo que permite valorar si el ajuste es bueno, es el criterio del cinetista y el valor de los parámetros estadísticos de ajuste obtenidos para cada modelo.

De los modelos postulados, el que mejor se ajusta a los datos experimentales, es aquel de menor complejidad y que ofrezca los valores más pequeños de los parámetros estadísticos de ajuste según el principio de mínima parsimonia excepto para el valor del coeficiente de determinación cuyo valor óptimo es 1 (Pazo, S., 2001).

En definitiva, la utilización de métodos modelo-dependiente o independiente es una estrategia en la modelización del sistema biológico en estudio, caracterizando la cinética del fármaco según los parámetros farmacocinéticos y con estos valores, hallar la dosis terapéutica. A continuación, se describen algunos de los parámetros farmacocinéticos más utilizados.

1.5. Parámetros farmacocinéticos.

1.5.1. Constantes de velocidad.

Gibaldi, M. (2006) menciona que las constantes de velocidad caracterizan los cambios temporales de la concentración de un fármaco en un sitio en particular. Permiten calcular la velocidad con la que un fármaco ingresa a cada compartimiento, se distribuye entre compartimientos (por ejemplo, entre el compartimiento central y el periférico) y se elimina del organismo. En el caso de una cinética lineal, la transferencia de masa entre compartimientos se puede describir por las constantes de velocidad descritas por:

$$\frac{dD}{dt} = -k D^n$$

La ecuación queda definida por la cantidad de fármaco (**D**) en un tejido o fluido en particular a un tiempo **t**. El número **n** representa el orden de reacción y **k** corresponde a la constante de velocidad de la reacción.

En general, **k** es una constante de velocidad de primer orden y las unidades se expresan como la inversa del tiempo (por ejemplo, h^{-1}). De manera genérica, se denomina **λ_z** a la constante de la velocidad de eliminación la cual representa la suma de las constantes de velocidad de los procesos de eliminación del fármaco intacta o luego de su metabolismo. Bajo la suposición de un modelo monocompartimental, la constante de eliminación **λ_z** se denomina ***k_{el}*** y en el caso de un modelo bicompartimental recibe la denominación de **β** . Graficando el logaritmo natural de las concentraciones del fármaco en sangre en función del tiempo de recolección de las muestras, se linealiza la porción del perfil plasmático correspondiente a la fase de eliminación. Considerando dos valores de concentración **C1** y **C2**, calculados a **t1** y **t2**, respectivamente, se obtiene:

$$\lambda_z = \frac{\ln C1 - \ln C2}{t2 - t1}$$

A partir de la constante de eliminación se calcula el tiempo de vida medio de eliminación (**T1/2**). Este parámetro indica el tiempo necesario para que la concentración de fármaco

disminuya a la mitad de su valor inicial. Nuevamente, considerando una cinética de primer orden, el parámetro se calcula según la ecuación:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda_z}$$

1.5.2. Volumen de distribución.

Lorenzo, P. y colaboradores (2004) definen que el volumen de distribución es un factor que relaciona la cantidad de fármaco administrado con su concentración en el organismo. El parámetro se corresponde con el volumen hipotético que se obtendría si todo el fármaco administrado sólo estuviese presente en el torrente sanguíneo. Sin embargo, carece de una correlación real, por lo cual se lo denomina volumen de distribución aparente.

Luego de la administración, el fármaco se distribuye en los distintos tejidos y alcanza el nivel intracelular. El valor del volumen de distribución dependerá del grado de dicha distribución.

El valor del parámetro es característico de cada fármaco y de cada paciente en particular. Si bien se asume que el fármaco se equilibra rápidamente en el organismo, cada tejido puede presentar una concentración diferente de fármaco por las diferencias en cuanto a la afinidad del tejido por el fármaco. La ecuación general relaciona:

$$V_d = \frac{D}{C_p}$$

La ecuación anterior expresa que para valores pequeños de **C_p**, el fármaco se halla predominantemente en tejidos periféricos, resultando en un valor elevado de **V_d**. Si en cambio, el fármaco se une preferencialmente a las proteínas plasmáticas o permanece en la región vascular, resultará en un **V_d** pequeño. Es decir, el parámetro se debe considerar como un factor de proporcionalidad entre la cantidad de fármaco en el organismo y la contenida en el torrente circulatorio.

1.5.3. Aclaramiento.

El aclaramiento es una medida del grado de eliminación de un fármaco independientemente del mecanismo por el que se produce. Considerando al organismo como un compartimento constituido por un fluido de volumen de distribución fijo, en el cual se disuelve una cantidad de fármaco, el aclaramiento queda definido como el volumen de fluido que es depurado de fármaco por unidad de tiempo. También se le define como el cociente entre la velocidad de

eliminación del fármaco (dD_u / dt) y la concentración plasmática al mismo tiempo expresada según la ecuación (Lorenzo, P., et al. 2004):

$$Cl = \left(\frac{dD_u}{dt}\right) / C_p$$

Mientras la velocidad de eliminación se describa con una cinética de primer orden, se puede considerar el aclaramiento como un parámetro constante para cualquier concentración plasmática de fármaco. Asumiendo una cinética de eliminación de primer orden y considerando las ecuaciones previamente planteadas, se deduce que:

$$CL = \lambda_z V_d$$

El aclaramiento calculado se denomina aclaramiento total y representa la suma de los diferentes caminos por los cuales un fármaco se elimina del organismo, fundamentalmente la vía urinaria (aclaramiento renal) y hepática (aclaramiento hepático).

Es importante señalar que tanto el aclaramiento como el volumen de distribución pueden calcularse a partir del valor del área bajo la curva, considerando la siguiente relación (D: dosis administrada; F: fracción de la dosis biodisponible):

$$ABC = FD / KV_d$$

1.5.4. Biodisponibilidad.

Se entiende por biodisponibilidad a "la cantidad y velocidad con la que un principio activo alcanza la biofase o el sitio de acción". Como en la práctica, existe una buena correlación entre las concentraciones de fármaco en plasma y la hallada en tejidos altamente perfundidos, o por incapacidad operativa de tomar muestras de la biofase efectora, se considera que el término de biofase puede ser reemplazado por el de circulación sistémica.

La determinación de la biodisponibilidad absoluta se calcula mediante el cociente entre el área bajo la curva luego de la administración del fármaco por las vías extravascular e intravenosa (ABC e.v y ABC i.v, respectivamente), corregido por las respectivas dosis. La ecuación obtenida es:

$$F = \frac{(ABC \text{ e.v}) \times Dosis \text{ i.v}}{(ABC \text{ i.v}) \times Dosis \text{ e.v}}$$

Como se observa de la ecuación anterior, es fundamental para el cálculo de la fracción biodisponible el área bajo la curva (ABC). Este parámetro es una medida de la cantidad total de fármaco inalterada que alcanza la circulación sistémica. Se considera un parámetro robusto, es decir, que no cambia su valor ante pequeñas modificaciones, ya que el cálculo de su valor se realiza a partir de un conjunto de datos. El ABC puede calcularse con base a un modelo compartimental propuesto o asumiendo la hipótesis modelo independiente. Es

indispensable la correcta estimación de su valor para la determinación confiable del conjunto de parámetros que se calculan a partir de éste, incluyendo la biodisponibilidad (Rescigno, A. 2000).

Luego de una administración intravenosa, la dosis completa se deposita instantáneamente en la circulación sistémica y el fármaco se considera completamente biodisponible ($F=1$). En la administración oral, la fracción biodisponible (F) depende de la cantidad de fármaco absorbida desde el tracto gastrointestinal y del metabolismo de primer paso. Cuanto más extenso es el metabolismo del fármaco, menor es la fracción biodisponible. Así, el valor de F para la vía extravascular está comprendido entre 0 y 1 (Rani, S. y Pargal, A. 2004).

Considerando el cociente entre el área bajo la curva obtenida luego de la administración de un fármaco contenida en un producto respecto del valor calculado para un producto de referencia, se obtiene la biodisponibilidad relativa. Los dos productos deben ser administrados por la misma ruta en la misma dosis, pero puede diferir el tipo de formulación.

En definitiva, el valor de la fracción biodisponible de un fármaco determina la dosis necesaria para alcanzar concentraciones terapéuticas, según por la relación:

$$D = ABC K Vd / F$$

Las ecuaciones descritas hasta el momento permiten el cálculo de los parámetros cinéticos considerando un método no compartimental o modelo independiente. Los cálculos sólo se basan en ecuaciones y algoritmos matemáticos que relacionan los parámetros entre sí. Considerando un modelo compartimental, la ecuación general que describe la concentración del fármaco en un fluido determinado se obtiene calculando:

$$C(t) = \sum A_i e^{-z_i t}$$

La variación temporal de la concentración plasmática queda descrita por los coeficientes A_i y las constantes híbridas o constantes de velocidad z_i .

La cantidad de términos de la sumatoria dependerá del número de compartimientos considerados y de la vía de administración. Luego de una dosis intravenosa y considerando un modelo bicompartimental, la ecuación considera un término más debido a la fase de distribución:

$$C(t) = A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}$$

Las constantes α y β son constantes híbridas que denotan las fases de distribución y eliminación, respectivamente. Los valores de A y B (macroconstantes) se pueden obtener gráficamente utilizando el método de las residuales o bien por métodos de cálculo iterativos (Toutain, P. y Bousquet-Mélou, A. 2004).

A través de algoritmos matemáticos que relacionan los parámetros primarios α y β , se obtienen los parámetros secundarios. Algunos parámetros secundarios que se calculan son el área bajo la curva, el aclaramiento, el volumen de distribución, los coeficientes A_i , las microconstantes (constantes de velocidad de transferencia entre compartimientos) y el tiempo de vida media.

1.6. Sistemas para vía percutánea.

Aunque la liberación de fármacos por vía transdérmica es recomendable fundamentalmente para principios activos con una potencia relativamente elevada y bajo peso molecular, la selección del principio activo está determinada por diversos factores, incluyendo las propiedades fisicoquímicas del fármaco, su interacción con la membrana y sus propiedades farmacocinéticas. Al aplicar una formulación en la superficie de la piel, se desencadena una secuencia de procesos que permiten que al final, el principio activo llegue a circulación sistémica (Figura 8), estos incluyen (Mohammed Haneefa et al., 2013):

- a) Liberación de la formulación
- b) Partición entre el estrato córneo (capa más externa) y la formulación.
- c) Difusión a través del estrato córneo
- d) Partición del estrato córneo (lipídico) hacia la epidermis viable (acuosa)
- e) Difusión de la epidermis viable hacia la dermis
- f) Entrada a circulación sistémica

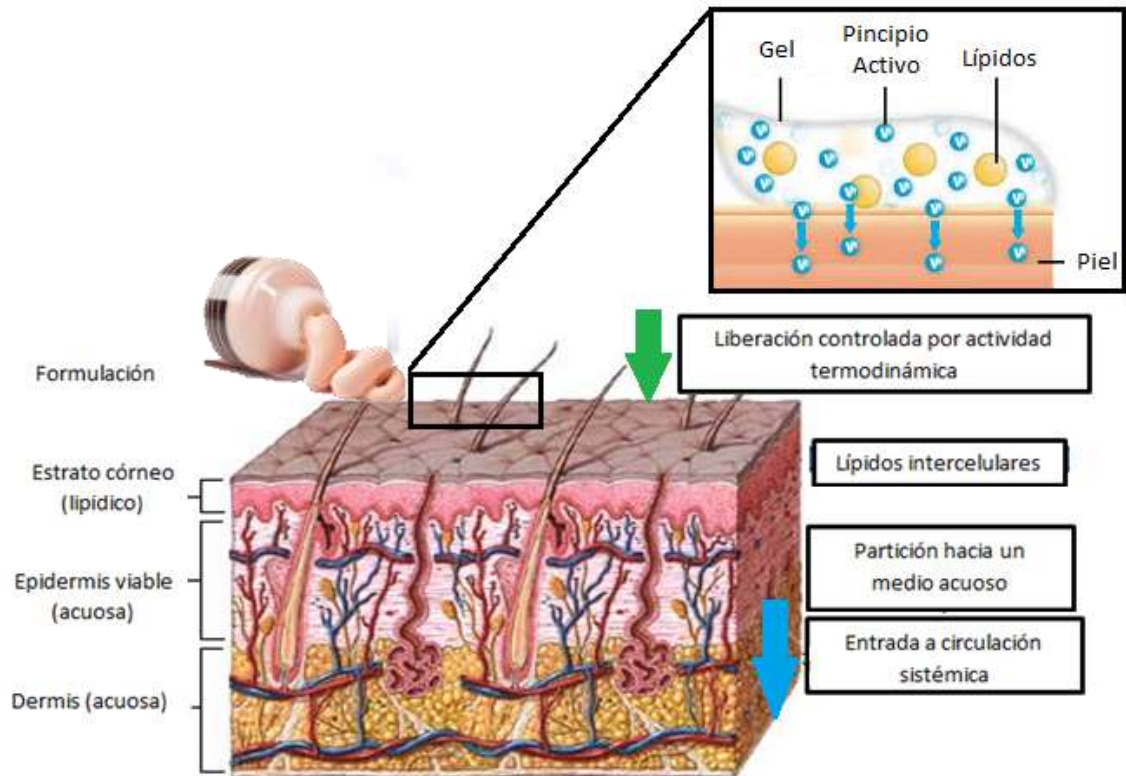


Figura 8. Procesos involucrados en la penetración y/o absorción de una sustancia a través de la piel (Mohammed Haneefa et al., 2013; Bernad et al.).

Un sistema de liberación transdérmica es una formulación o dispositivo (por ejemplo, un parche) que permite una liberación controlada del fármaco (por tanto, mantiene una concentración plasmática constante), por un periodo prolongado (Bernad et al.).

1.6.1. Estructura de la piel canina.

El autor Scott y colaboradores (2001), ven desde un punto de vista evolutivo, la piel no cuenta con un epitelio destinado a la absorción, al contrario, constituye una barrera altamente eficiente, al prevenir no sólo la entrada de sustancias exógenas, sino también al frenar la pérdida de agua. Frecuentemente se tiene la impresión de que la piel cuenta con una estructura simple y únicamente enfocada a sus propiedades como barrera; sin embargo, la piel es un órgano complejo y dinámico, que cuenta con múltiples funciones además de su papel como barrera.

Anatómicamente, la piel está dividida en epidermis, dermis e hipodermis. La epidermis constituye la capa más externa y está formada por un epitelio escamoso estratificado queratinizado (Figura 9), constituido en su mayor parte por queratinocitos, aunque también

están presentes otras variedades de células como los melanocitos (producción del pigmento), las células de Langerhans (función inmunológica), y las células de Merkel (percepción sensorial).

La epidermis sigue un ordenado patrón de proliferación, diferenciación y queratinización, el cual se inicia en el estrato basal (capa más profunda) con la producción y proliferación de nuevas células. En el estrato espinoso, constituido principalmente por células poliédricas, aparecen por primera vez los llamados gránulos lamelares o cuerpos de Odland, en los cuales se lleva a cabo la síntesis y almacenamiento de lípidos. El estrato granuloso está formado por células de forma plana que poseen un gran número de gránulos lamelares. En este nivel se lleva a cabo un proceso fundamental para la formación de la barrera: en la interfase entre el estrato granuloso y el estrato córneo, los gránulos lamelares se funden con la membrana celular, liberando su contenido lipídico al espacio intercelular. Los lípidos liberados se reorganizan en forma de lamelas, las cuales conforman la barrera de permeabilidad. La capa más externa, el estrato córneo, está formada principalmente por células muertas, completamente queratinizadas, desprovistas de núcleo y organelos citoplásmicos (Scott et al., 2001).

La dermis es la estructura más importante de la piel. Está compuesta por una red densa de fibras, células, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios y músculos. Los fibroblastos son las células más numerosas, responsables de formar las fibras de colágeno o elastina. También podemos encontrar mastocitos, macrófagos, linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, células plasmáticas y melanocitos, se puede observar en la Figura 9.

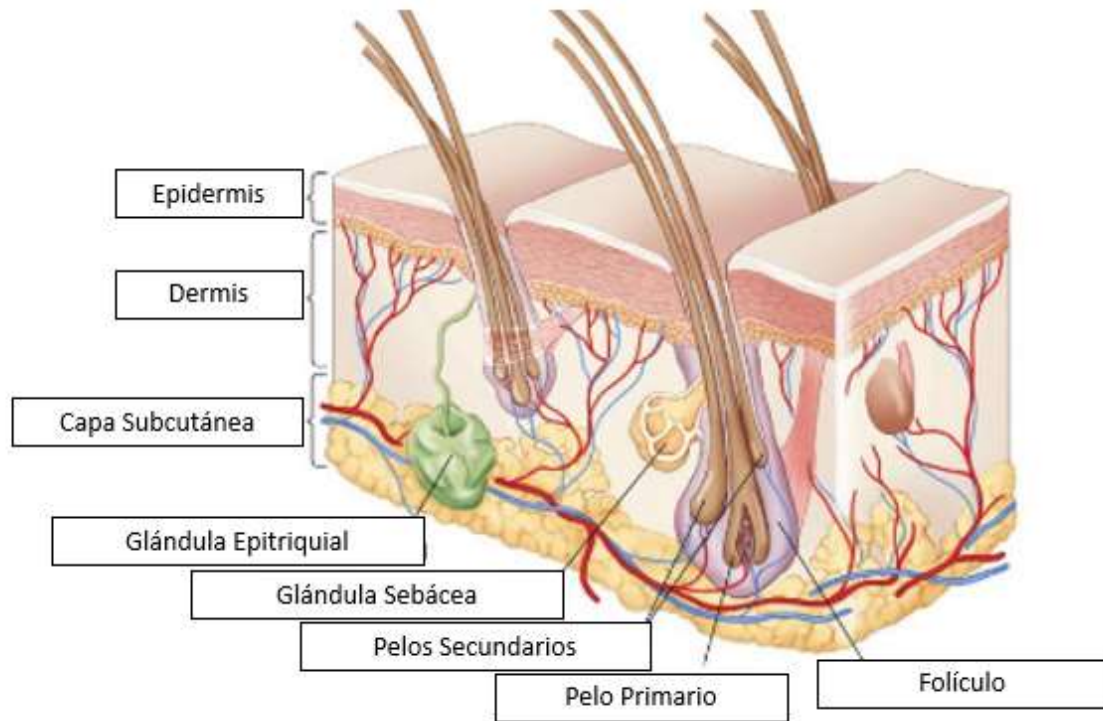


Figura 9. Estructura de la Piel y Folículo Animal (Scott et al., 2001).

La piel también presenta folículos pilosos denominados invaginaciones epidérmicas en la dermis, que pueden llegar a la epidermis con su porción bulbar profunda. Producen y sostienen la porción intradérmica del tallo piloso. Se dividen en: a) infundíbulo: de pelo. Comprende la parte que va desde la superficie de la epidermis al punto donde desembocan las glándulas sebáceas. b) istmo: desde la desembocadura de las glándulas sebáceas hasta la inserción del músculo erector del pelo. c) bulbo: desde la inserción del músculo erector del pelo hasta la papila dérmica. Además, los perros tienen folículos pilosos compuestos o en grupos que consisten en 2 a 5 pelos primarios rodeados por grupos de pequeños pelos secundarios, en total, 2 a 15 pelos por grupo y está profundamente enraizado en la dermis; los pelos primarios generalmente emergen a través de poros separados (Dellman, D., 1993).

1.6.2. Absorción percutánea.

Los lípidos intercelulares del estrato córneo constituyen la principal barrera para la absorción de sustancias aplicadas en la piel. Diversos estudios han determinado que el transporte de sustancias ocurre primordialmente por vía intercelular, aunque no hay que olvidar que la vía folicular puede, en algunos casos, ser una ruta de interés.

El proceso de transporte de sustancias a través de la piel está controlado por simple difusión pasiva. Las leyes de Fick pueden aplicarse para analizar datos de permeación y al mismo tiempo pueden ser predictivas.

$$J = \frac{DK\Delta C}{h}$$

La primera ley de Fick (ecuación arriba), describe una difusión en un estado estacionario. Aquí, **J** es el flujo, **D** es el coeficiente de difusión en la piel, **K** es el coeficiente de partición piel/vehículo. En condiciones normales, la concentración aplicada (**Cap**) es mucho mayor que la concentración dentro de la piel, por lo que la ecuación anterior puede escribirse como:

$$J = KpCap$$

Kp=DK/h es el coeficiente de permeabilidad (cm h⁻¹), su magnitud depende, entre otras cosas, del grosor de la membrana (**h**), el cual no puede ser estimado con exactitud, debido a la tortuosidad de los espacios intercelulares.

Las leyes de difusión de Fick muestran que el flujo (**J**) se incrementa linealmente con la concentración hasta que **Cap** alcanza el valor de la solubilidad. Se ha demostrado que soluciones sobresaturadas presentan flujos mayores que los de soluciones saturadas. Si se aplican soluciones saturadas de un fármaco en diferentes vehículos y el vehículo no altera las propiedades de la membrana, el flujo será el mismo para todas las soluciones Barr, M. (1962).

1.6.2.1. Moduladores de absorción.

Una de las principales funciones de la piel es fungir como barrera de permeabilidad, de modo que la administración de sustancias se ve afectada de manera importante por esta razón. De hecho, la impermeabilidad de la piel es un gran problema cuando se requiere administrar fármacos en la piel o a través de ella, pues es frecuentemente sólo un pequeño porcentaje del activo alcanza el sitio de acción.

Es por ello que, en las últimas tres décadas numerosos grupos de investigadores han enfocado sus esfuerzos hacia la búsqueda de estrategias que permitan alterar la barrera y con ello facilitar la administración de sustancias por vía transdérmica. Como resultado de estos estudios surge el término de moduladores de absorción, que se refieren a aquellos medios (físicos o químicos) que permiten regular (incrementar o disminuir) la permeabilidad

de la piel. Los moduladores pueden dividirse de acuerdo a su efecto en promotores (aquellos que favorecen la penetración y/o absorción de sustancias a través de la piel) y retardadores (los que retardan o disminuyen la absorción) (Finnin, B. y Morgan, T. 1999).

La gran diversidad estructural de las sustancias promotoras hace difícil resumir sólo en algunos puntos su mecanismo de acción. Sin embargo, a continuación, se describe de manera simplificada algunos de estos mecanismos:

a. Incremento en la fluidez de la bicapa lipídica de la membrana.

El promotor puede intercalarse entre las bicapas y provocar la disrupción del paquete lipídico intercelular (incremento en la fluidez de los lípidos). A este respecto, diversas técnicas biofísicas (e.g. calorimetría diferencial de barrido y espectroscopía infrarroja) han demostrado que existe una correlación entre la fluidez lipídica y permeabilidad. Este incremento de la fluidez puede atribuirse a que los lípidos sufren una transición de una fase gel (rígida) a una fase líquido cristalina, con una reducción de la temperatura de transición vítrea. Dos de los compuestos más investigados que se ha demostrado causan desorden al intercalarse ente las cadenas lipídicas son: la Azona (Laurocapram) y el ácido oleico (Fujii, M.; et al., 2000).

b. Extracción de los lípidos intercelulares.

Ciertos promotores pueden incrementar la permeabilidad de la piel al extraer los lípidos intercelulares. Este es un efecto más drástico que el anterior, y por lo tanto, debe tenerse muy en cuenta la reversibilidad del mismo. La remoción de los lípidos del estrato córneo permite incrementar la velocidad de permeación tanto de sustancias polares como no polares. Diversos solventes como el etanol y algunos surfactantes son capaces de extraer los lípidos (Perhing, et al., 1990).

c. Interacción con los componentes proteicos.

Algunos promotores aumentan la permeabilidad de la membrana al alterar la conformación, desnaturalizar e incluso extraer las proteínas de membrana, como es el caso de algunos surfactantes, sobre todo de naturaleza iónica (Cooper, E. 1984).

d. Alteración de la barrera enzimática.

Los inhibidores enzimáticos también pueden fungir como promotores de absorción, si se considera que la capacidad metabólica de la piel puede actuar como una barrera de tipo enzimático (Carpentieri, L., 2007).

e. Incremento en la actividad termodinámica del soluto.

Esta puede verse afectada por la composición del vehículo, la cual va a influir directamente en la solubilidad del penetrante. Una forma de aumentar el coeficiente de partición piel/vehículo, consiste en el uso de sistemas saturados, lo cual puede lograrse eligiendo adecuadamente los componentes de la formulación (Bennet, S., et al., 1985).

f. Co-difusión del promotor y el soluto.

Se ha demostrado que ciertos promotores como el propilenglicol, transcutol, etanol y dimetilsulfóxido, son capaces de difundir a través de la piel, arrastrando junto consigo al penetrante. La penetración del promotor hacia los espacios intercelulares del estrato córneo puede traer como consecuencia la sustitución del agua por moléculas de solvente, lo cual puede favorecer el incremento del coeficiente de partición piel/vehículo al alterar las características de solubilidad del soluto en la piel.

Es importante señalar que la mayoría de los promotores no actúan por un solo mecanismo, sino que el efecto promotor suele ser el resultado de varios mecanismos. Además, se ha encontrado que con la combinación de ciertos promotores hay un efecto sinérgico. Un claro ejemplo de estos es la combinación de Azona y propilenglicol (Ho, H.; et al. 1994).

Por desgracia, un gran inconveniente de los promotores es que generalmente están asociados la eficiencia con su toxicidad. Así, los promotores más efectivos son los que causan mayor irritación o daño en la piel. Es por ello que muchos de los estudios a este respecto se han dado a la tarea de tratar de esclarecer el mecanismo de acción de los promotores y de esta forma buscar nuevas entidades, más eficientes y menos tóxicas para la piel. Además de los promotores de tipo químico mencionados hasta ahora, también se han empleado métodos físicos (e.g. iontoforesis, electroporación, sonoforesis) para facilitar el transporte a través de la piel. De entre ellos, seguramente la iontoforesis es la que más éxito ha tenido. La iontoforesis consiste en aplicar un potencial eléctrico con el fin de promover el paso de sustancias ionizables, aunque debido al flujo convectivo inducido por

la iontoforesis (llamado electroósmosis), el paso de especies sin carga también se ve favorecido (Carpentieri, L., 2007).

1.6.3. Selección de los fármacos para un sistema transdérmico.

Un fármaco debe cumplir con ciertos requisitos para que se considere como un posible candidato para ser formulado en un sistema transdérmico, algunos de ellos se mencionan a continuación (Chandrashekar, N. S., y Shobha Rani, R. H., 2008):

1. Los fármacos deben tener una potencia farmacológica tal, que solo se requiera una sola dosis diaria de unos cuantos miligramos. Esto se justifica, por un lado, por las características de la barrera de la piel que limitan la absorción de grandes cantidades de fármaco, y, por otro lado, por el hecho de que un sistema de liberación transdérmico no debe cubrir un área de más de 50 cm², lo cual restringe la cantidad de fármaco que puede contener.
2. El tiempo de vida media del fármaco debe ser relativamente corto. No es conveniente producir un sistema transdérmico para un activo de tiempo de vida media muy largo.
3. El fármaco debe tener un índice terapéutico relativamente amplio de modo que las variaciones interindividuales en absorción no constituyan un problema para ajustar a la dosis.
4. Ni el fármaco ni los otros componentes de la formulación deben provocar irritación en la piel, sobre todo tomando en cuenta que el sistema puede ser oclusivo y permanecer en la piel por periodos prolongados.
5. Fármacos con un metabolismo presistémico importante o un tiempo medio de eliminación corto, son buenos candidatos para ser administrados por esta vía.
6. El fármaco no debe exhibir cinéticas dependientes del tiempo, ya sea por inducción o por inhibición metabólica o por cambios en la distribución o excreción, lo que implicaría que la velocidad de liberación tendría que ajustarse repetidamente debido a estos cambios.
7. En el caso de fármacos que desarrollen un proceso de compensación fisiológica el uso de sistemas transdérmicos con velocidades de liberación convencionales puede no ser conveniente. Liberaciones pulsátiles (en fases) más que constantes o con periodos de "limpieza", pueden permitir la administración de más de una amplia gama de principios activos.

1.7. Emulgel.

La administración tópica de fármacos es un sistema de suministro para cualquier zona del cuerpo. Las preparaciones tópicas presentan amplias ventajas ante formas farmacéuticas convencionales, estas están aplicando un amplio espectro de preparaciones en su formulación y su consistencia varía, pero los productos populares con mayor innovación son preparaciones semisólidas. Dentro del grupo principal de preparaciones semisólidas, el uso de geles y emulsiones se ha expandido en preparaciones farmacéuticas.

Los geles son formas farmacéuticas de consistencia semirrígida destinados a aplicarse sobre las membranas mucosas y piel, considerados como una clase relativamente nueva de forma de dosificación que contiene él o los principios activos, creada por el atrapamiento de grandes cantidades de líquido acuoso, hidroalcohólico o aceite en una red de partículas sólidas coloidales. A pesar de las muchas ventajas de los geles, una limitación importante es la dificultad en la administración de fármacos hidrofóbicos.

Las emulsiones aceite en agua y agua en aceite son ampliamente usadas por sus propiedades terapéuticas y como vehículos para la entrega de varios fármacos lipofílicos en la piel (Eccleston G. M., 1992). Las emulsiones poseen cierto grado de elegancia y son fáciles de lavar siempre que se desee, además de una alta capacidad de penetrar en la piel, asimismo el formulador puede controlar la viscosidad, apariencia y el grado de untuosidad de emulsiones. Las emulsiones aceite en agua son de las más usadas como base de fármacos fácilmente lavables y por lo general con propósitos cosméticos, mientras que las emulsiones agua en aceite son empleadas ampliamente para tratamientos de piel seca y aplicaciones emolientes (Rieger M.M., 1986).

Cuando los geles y las emulsiones se usan en forma combinada, las formas de dosificación se denominan emulgeles, la presencia de un agente gelificante en la fase acuosa convierte una emulsión clásica en un emulgel. Los emulgeles para uso en dermatología deben poseer propiedades favorables tales como: ser tixotrópico, sin grasa, de fácil aplicación, fácilmente removible, emoliente, no manchar, compatible con varios excipientes y solubles o misible en agua (Klich C.M., 1992). Tiene una alta aceptación por el paciente ya que poseen las ventajas anteriormente mencionadas de las emulsiones y los geles. Por lo tanto, se han utilizado recientemente como vehículos para la administración de varios fármacos en la piel o a través de ella. (Abd El-Bary et al., 2001; Zhang et al., 1995; Hamza Y.E. et al., 2002)

1.8. Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

En el libro de Willard y colaboradores (2002), define a la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) o bien High Performance Liquid Chromatography (HPLC por sus siglas en inglés), es una técnica que se emplea para separar y determinar especies en diversos materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos.

Consta de una fase móvil líquida interactiva en adición a una fase estacionaria activa, en donde la fase móvil es un disolvente líquido que contiene la muestra como mezcla de solutos.

Los tipos de CLAR suelen clasificarse según el mecanismo de separación o el tipo de fase estacionaria, pudiendo ser ambas fases líquidas (Cromatografía Líquido/Líquido-CLL) en la cual el proceso de separación es mediante un proceso de partición. La fase móvil eluente (es un líquido) y la fase estacionaria (es un sólido) (Cromatografía Líquido/Sólido-CLS), en la cual el proceso de separación se lleva a cabo por adsorción, intercambio iónico o exclusión por tamaño (Hanai, T. 1999).

1.8.1. Instrumentación.

El diagrama que muestra Skoog D. A. y West D. M. (2001), es de la Figura 10 se puede observar la estructura básica de la CLAR consiste de un sistema de bombeo para la fase móvil, inyector, columna, detector, sistema de registro y manejo de datos.

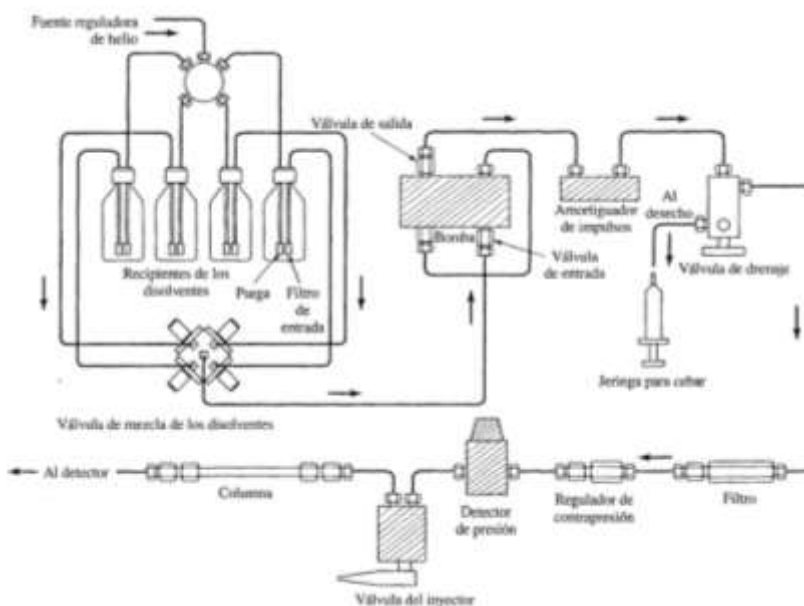


Figura 10. Diagrama de bloques que muestra los componentes de un aparato de CLAR típico. (Skoog D. A. y West D. M., 2001)

1.8.2. Aspectos importantes en el análisis por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

Se realizó un recopilado de los siguientes autores Wilfred M. A., (2006); Robards K. y Haddad P. R. (2004) y Skoog D. A. y West D. M. (2001), coinciden en que la cromatografía de líquidos de alta resolución se ha convertido en una herramienta importante en el análisis químico, debido por una parte su capacidad para separar mezclas orgánicas complejas, compuestos organometálicos y sistemas bioquímicos. Su otra aplicación es como método para determinar cuantitativa y cualitativamente los componentes de la muestra.

Para el análisis cualitativo se suele emplear el tiempo de retención, que es único para cada compuesto bajo determinadas condiciones. En aplicaciones cuantitativas, integrando las áreas de cada compuesto o midiendo su altura, con los calibrados adecuados, se obtiene la concentración o cantidad presente de cada analito.

Algunos de los aspectos importantes que se deben considerar para la cromatografía de líquidos de alta resolución son los siguientes (McPolin, O. 2009):

- a) **Recipientes de la fase móvil.** Los recipientes para almacenar la fase móvil tienen que ser inertes, es decir, el disolvente no deberá extraer especie alguna del material con el que estén contruidos y deben contar con una tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas ambientales al sistema. Suelen ser botellas de vidrio, están provistos de unos filtros, indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil.
- b) **Fase móvil.** Los disolventes empleados como fase móvil deben poseer las siguientes propiedades:
 - Alto poder solubilizante de las muestras.
 - Baja reactividad.
 - Baja viscosidad.
 - Alto grado de pureza.
 - Seguridad.

La fase móvil debe filtrarse en filtros de 0.45 o 0.22 micras ya que las partículas presentes pueden bloquear filtros y tuberías del instrumento, acelerar desgaste de sellos, rotores del inyector y afectar el movimiento normal de válvulas de entrada y salida de bombas. Posteriormente debe desgasificarse ya que los gases disueltos en ella pueden provocar liberación y formación de burbujas en la celda del detector y provocar oscilación en la línea base y aparición de picos fantasma.

- c) **Bomba.** Impulsa la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector y desde allí hacia la columna, deben cubrir los siguientes requisitos: Generar presiones de más de 6000 psi (lb/pulg²). Proporcionar velocidades de flujo de 0.1 a 10 mL/min de manera constante y reproducible. Ser inertes y resistentes a la corrosión por diversos disolventes.
- d) **Sistema de inyección de muestras.** El inyector tiene como función introducir la muestra dentro de la línea de alta presión donde se encuentra la corriente del disolvente a través del sistema. Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones, debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida y debe ser fácil de operar.
- e) **Tuberías.** Conectan al reservorio de la fase móvil con la bomba, deben ser inertes y resistentes a altas presiones.
- f) **Uniones.** Permiten conectar las tuberías y con ellas, los distintos componentes del sistema cromatográfico. Estas deben ser inertes a fases móviles y muestras, deben cerrar herméticamente evitando la fuga de fase móvil y la introducción o formación de burbujas.
- g) **Columna.** En las columnas cromatográficas es donde se produce la velocidad diferencial de los solutos que permite su separación, el material externo de las columnas cromatográficas de acero inoxidable cuya longitud varía de 2 a 25 cm y un diámetro de 1 a 46 mm, mientras que el material interno suele variar proporcionándole las características propias de cada columna. El costo de las columnas es elevado y se pueden dañar con facilidad, por eso, en algunos casos se protege la entrada de la columna con otra más corta, la pre-columna o guarda-columna, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible.
- h) **Detector.** Es la parte del equipo cromatográfico que indica los momentos de aparición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. El detector utilizado depende de la naturaleza de la muestra y deberá reunir las siguientes características: Tener un rango amplio de respuesta, que posea una sensibilidad apropiada. Poseer una respuesta lineal (el detector debe medir alguna propiedad del analito que se incremente proporcionalmente al aumentar su concentración) y reproducible. No afectarse por cambios de temperatura.

Dependiendo de la selectividad y sensibilidad que se requiera se pueden emplear varios tipos de detectores, entre los más comunes se encuentran (Parriott, D., 1993):

- a) **Detector de UV-Visible.** El más usado en CL, su respuesta se fundamenta en la absorbancia que presentan la mayoría de los compuestos orgánicos a una longitud de onda determinada, son satisfactorios para la elución en gradiente con solventes que no absorben. Se utiliza para todas aquellas sustancias que tienen uno o más dobles enlaces conjugados y los compuestos con electrones no enlazados y no compartidos.
- b) **Detector de Índice de Refracción.** Mide la refracción del disolvente a causa de las moléculas del analito, es general, no selectivo, y responde a la presencia de todos los solutos, siendo utilizado para analizar sustancias que no absorben en el UV como carbohidratos, lípidos y polímeros, entre otros. Su desventaja es que posee una sensibilidad hasta cierto punto limitada, (Rouessac F. y Rouessac A., 2003) ya que es de unas mil veces menor a un detector UV y no es útil para la elución en gradiente.
- c) **Detector electroquímico.** Es bastante selectivo, porque solo ciertos analitos se oxidan o se reducen con facilidad. (Skoog D. A. y West D. M., 2001) Estos detectores son simples y se basan en medidas potenciométricas, conductométricas y voltamétricas. Entre los compuestos típicos que se analizan se incluyen las aminas aromáticas y sus derivados. (Rouessac F. y Rouessac A., 2003)
- d) **Detectores de fluorescencia.** Son especialmente sensibles, pero responden solo a la muy limitada gama de analitos que fluorescen. Para incrementar la aplicación de los detectores electroquímicos y de fluorescencia, es posible unir a los analitos deseados grupos químicos que sean electro activos o fluorescentes. (Skoog D. A. y West D. M., 2001)
- e) **Detector selectivo de masas.** Provee información estructural que ayuda a la identificación del analito de interés.

1.9. Cuantificación de fármacos en fluidos biológicos.

En los fluidos biológicos el fármaco de interés se encuentra inmerso en una mezcla compleja de carbohidratos, proteínas, lípidos y otros componentes, que pueden interactuar entre sí interfiriendo su determinación. Es por ello que la selección de la matriz biológica en la que se realizará la cuantificación de fármacos, se vuelve un factor importante durante el desarrollo de un método analítico, generalmente depende directamente de la vía de eliminación y farmacocinética del analito. En algunos casos la selección se limita a depender de los alcances del método. La sangre, el plasma, el suero y la orina son los fluidos biológicos más comúnmente utilizados para el análisis de fármacos.

1.9.1. Tratamiento de muestras biológicas.

El procesamiento de una muestra biológica, es un paso crítico en la cuantificación de fármacos, ya que se prefiere que sea de aplicación fácil, rápida y de bajo costo, por lo que es deseable que el procesamiento de la muestra biológica sea lo más sencillo posible y con la menor manipulación de la muestra, para tener métodos rápidos, económicos y reproducibles.

Las principales técnicas empleadas en el procesamiento de muestras son las siguientes (McMaster, M., 2007; Brown, P., 1984).

- a) **Filtración.** Los principales problemas que se presentan al utilizar esta técnica son la adsorción del analito al filtro, la aparición de picos adicionales causados por los componentes del filtro, y la obtención de una cantidad de muestra pequeña.
- b) **Ultrafiltración.** Esta técnica se utiliza cuando los fármacos presentan baja unión a proteínas, la separación se realiza basada en la diferencia existente en los tamaños moleculares y la aplicación de una centrifugación a altas velocidades. Esta técnica presenta la ventaja de ser sencilla y rápida de aplicar ya que representa poca manipulación de la muestra. Sin embargo, para su realización se requieren equipos especiales, lo que la hace costosa; además si el fármaco presenta una alta unión a proteínas la extracción se vuelve errática y poco reproducible.
- c) **Precipitación de proteínas.** Existen dos procedimientos que difieren en su principio y pueden ser utilizados para lograr la desnaturalización y precipitación de proteínas. El primero y más sencillo consiste en la adición de ácidos, sales o disolventes orgánicos para precipitar las proteínas. Los problemas asociados a este proceso es que el fármaco de interés puede degradarse o precipitar junto con las proteínas presentes en la matriz biológica. Con el uso de disolventes orgánicos, se puede contrarrestar ese problema. El segundo método consiste en la adición de enzimas proteolíticas como tripsina, proteínasa, papaina, sutilisina y ketodasa. Es un procedimiento muy eficiente para liberar los fármacos que se encuentran unidos a proteínas plasmáticas, sin embargo, al utilizar dichas proteínas se necesitan condiciones de temperatura y pH extremadamente controlados además de que las enzimas proteolíticas son específicas para ciertas proteínas.
- d) **Extracción.** Consiste en aplicar la muestra en estado líquido a un sistema de disolventes (extracción líquido-líquido) o a un medio de adsorción (extracción en fase sólida):

1. **Extracción Líquido-líquido.** Es la transferencia del analito desde una fase acuosa a una fase orgánica, el principio básico consiste en que el fármaco al encontrarse en su forma no ionizada, es más afín a la fase orgánica. La extracción de fármacos en fluidos biológicos se puede llevar a cabo en medio ácido ($\text{pH} \leq 3$) o en medio básico ($\text{pH} \geq 8$). La completa remoción de un fármaco de interés hacia la fase orgánica depende de varios factores, como el porcentaje de ionización dependiente del pH del medio, y del pka del fármaco, el volumen de las dos fases en la extracción y el número de extracciones utilizadas.
2. **Extracción en fase sólida.** Se basa en la separación de los componentes de una mezcla por la diferencia en la velocidad de migración de las moléculas de los componentes a través de la fase estacionaria. En esta técnica el adsorbente debe ser primeramente acondicionado con un disolvente apropiado, después del acondicionamiento, se pasa la muestra a través del adsorbente y las impurezas son eliminadas con un disolvente de lavado y finalmente, el analito se eluye con el disolvente apropiado.

1.10. Validación de métodos bioanalíticos.

En el ámbito internacional hay una gran variedad de organismos que establecen parámetros y/o características con las que debe cumplir un método analítico que se considere validado. La validación de estos métodos es crítica para poder llevar a cabo de manera exitosa los estudios preclínicos y/o biofarmacéuticos y farmacológicos. La validación de métodos bioanalíticos incluye todos aquellos procedimientos que demuestren que este método es confiable y reproducible en una matriz biológica como puede ser: sangre, plasma, orina o suero. Es común que métodos reportados en diversas publicaciones sean modificados de acuerdo a los requerimientos del laboratorio que realiza el ensayo. Todos los cambios deben ser validados incluso cuando son realizados a métodos anteriormente validados por el laboratorio (Skoog et al. 2005; NOM-177-SSA1-20013)

El Consejo Internacional de armonización de los requisitos técnicos para el registro de medicamentos de uso humano (o ICH, por sus siglas en inglés) es la conferencia que determina los parámetros base para ser aplicados en las a nivel legislativo por las autoridades reguladoras de medicamentos en Europa, Japón y Estados Unidos de América. Las pruebas son: especificidad, linealidad, exactitud, precisión, límite de detección y límite de cuantificación.

Las pruebas se basan en que el equipo, los instrumentos, las operaciones analíticas y las muestras son parte integral del sistema a evaluar. Los parámetros se establecen para el procedimiento en particular.

En Estados Unidos de America el organismo que establece los parámetros a considerar en un estudio biofarmacéutico y por tanto los criterios de validación de los métodos analíticos es la FDA (Food and Drug Administration) establecida en 1906 aunque sus inicios datan de 1901 como Buró de Química. Los principales parámetros para una validación de acuerdo a la FDA son: 1) exactitud, 2) precisión, 3) selectividad, 4) sensibilidad, 5) reproducibilidad y 6) estabilidad. En la Unión Europea está la EMEA (European Medicines Agency) establecida en 1995. De acuerdo a este organismo las características con las que debe cumplir un método analítico son: 1) estabilidad de las soluciones de referencia y del analito, 2) especificidad, 3) exactitud, 4) precisión, 5) límite de cuantificación y 6) función/factor de respuesta.

Como puede verse, las diferencias entre los requerimientos de ambos organismos son mínimas. En la mayoría de los países de América Latina se tienen reglamentos o normas individuales para la validación de un método analítico y la realización de estudios de biodisponibilidad/bioequivalencia. En la siguiente tabla 1 se muestra la legislación vigente para cada país.

Tabla 1. Legislación vigente sobre biodisponibilidad/bioequivalencia en países de América Latina

País	Legislación vigente
Argentina	ANMAT 3185/99
Brasil	ANVISA 987/99
Colombia	Decreto 677/95 Res. 1400/2001–1890/2001
Costa Rica	Reg. 28466-S
México	NOM-177-SSA1-2013

La Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, menciona las pruebas y criterios generales para la validación de un método analítico cuya aplicación será un estudio de biodisponibilidad y bioequivalencia.

Una vez que se ha desarrollado un método analítico para la cuantificación de un fármaco es necesario probar que es exacto y reproducible, para ello se somete a una validación.

La palabra validación se refiere a la evidencia experimental documentada de que un procedimiento cumple con el propósito para el que fue diseñado. Para llevar a cabo la validación, una vez establecidas las condiciones analíticas, es necesario incluir como mínimo los siguientes parámetros: (ICH, Q2(R1))

- a) Blanco. Muestra de matriz biológica procesada, que no contiene el analito de interés.
- b) Calibración. Conjunto de operaciones que determinan, bajo condiciones específicas, la relación entre los valores indicados por un instrumento o sistema de medición, o los valores representados por una medición material y los valores conocidos correspondientes a un patrón de referencia.
- c) Corrida analítica. Conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales.
- d) Curva de calibración. Se refiere al conjunto de concentraciones que describen el rango en el cual se cuantifica el compuesto por analizar.
- e) Doble blanco. Muestra procesada de matriz biológica que no contiene el analito de interés, ni estándar interno.
- f) Estabilidad de la muestra. Se refiere a la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características, desde el momento del muestreo hasta su análisis.
- g) Exactitud. Concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.
- h) Linealidad. Capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra.
- i) Límite de cuantificación. Concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método.
- j) Límite de detección. Mínima concentración de un compuesto en una muestra el cual puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas.
- k) Matriz biológica. Es el material de origen biológico en el cual se encuentra la sustancia de interés.

- l) Muestras control. Muestras de concentración conocida que se cuantifican durante la corrida analítica para corroborar la validez del método, estas no forman parte de la curva de calibración, sin embargo, están dentro del rango de trabajo.
- m) Precisión. Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.
- n) Rango. Intervalo de un método analítico definido, se puede caracterizar por uno o más intervalos constituidos al menos por cinco concentraciones distintas cada uno sin incluir las muestras blanco, siempre y cuando contengan puntos intermedios en común e incluyan el límite de cuantificación y concentración máxima del rango.
- o) Recuperación absoluta. Eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica.
- p) Repetibilidad. Precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes bajo las mismas condiciones.
- q) Reproducibilidad intralaboratorio. Precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas.
- r) Selectividad. Capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos presentes en la muestra.
- s) Tolerancia. Capacidad de un método analítico para obtener resultados precisos y exactos ante variaciones pequeñas pero deliberadas, en sus parámetros y condiciones de trabajo y que proporciona una indicación de su confiabilidad durante el uso normal.

1.11. Análisis de muestras.

Durante el análisis de muestras la ICH, Q2(R1) es necesario tomar en consideración varios puntos con el propósito de asegurar la confiabilidad de los resultados obtenidos:

- a) **Equipo.** Todo el equipo que se utilice para el transporte, el almacenamiento y el análisis de las muestras debe de estar dentro de un programa de verificación, mantenimiento y calibración. En cada análisis, se debe verificar que el funcionamiento del equipo es adecuado, siendo necesario que exista una evidencia

documentada de que el equipo se verificó periódicamente y de que se utilizó un equipo determinado.

- b) **Procedimientos normalizados de operación.** Este documento debe contener las instrucciones necesarias para llevar a cabo de manera reproducible una operación, el laboratorio donde se realice el análisis de las muestras debe contar con dichos procedimientos los cuales deben estar revisados, aprobados, firmados y fechados por personas autorizadas, además de ser actualizados regularmente.
- c) **Sustancia de referencia.** Sustancia de uniformidad reconocida destinada a utilizarse en comprobaciones analíticas, físicas, químicas o microbiológicas en el transcurso de las cuales sus propiedades se comparan con las sustancias en evaluación, esta debe contar con un certificado que avale su pureza y su identidad.
- d) **Reactivos y estándares.** Los estándares que se utilicen para llevar a cabo la cuantificación deben estar bien caracterizados.

Es importante que en cada análisis de muestras se incluya, una curva de calibración, muestras control de calidad, además de blancos del fluido biológico (tanto blanco como doble blanco). El análisis de las muestras control de calidad será indispensable para determinar si el análisis de muestras es confiable.

III. OBJETIVOS.

A. OBJETIVO GENERAL.

1. Realizar un estudio de biodisponibilidad de un sistema de liberación controlada de aplicación tópica (emulgel) conteniendo ivermectina, con el fin de conocer la concentración absorbida de fármaco en plasma y acción terapéutica, en perros con parasitosis.

B. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de ivermectina en plasma empleando la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), para la calidad, exactitud, la fiabilidad y la consistencia de los resultados analíticos.
2. Realizar los ensayos de calidad apropiados (pruebas organolépticas, pH, gravedad específica) y asegurar si la preparación del emulgel y su control se encuentran en condiciones correctas para su aplicación.
3. Determinar los parámetros farmacocinéticos ($C_{m\acute{a}x}$, K_{ab} , K_{el} , $t_{1/2}$, ABC y TMR) de la administración de ivermectina vía tópica, mediante un modelo matemático para demostrar la eficacia del emulgel con ivermectina.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

La parte experimental se llevó a cabo en dos etapas; primero el desarrollo y validación del método analítico por CLAR, seguido de la aplicación del método en el análisis de muestras plasmáticas provenientes de animales; en un estudio piloto de biodisponibilidad de ivermectina formulado en un emulgel para el tratamiento antiparasitario. A continuación, se hace una descripción detallada acerca de los materiales, equipos y sustancias empleadas durante estas etapas, así como de los procedimientos empleados en la Figura 11.

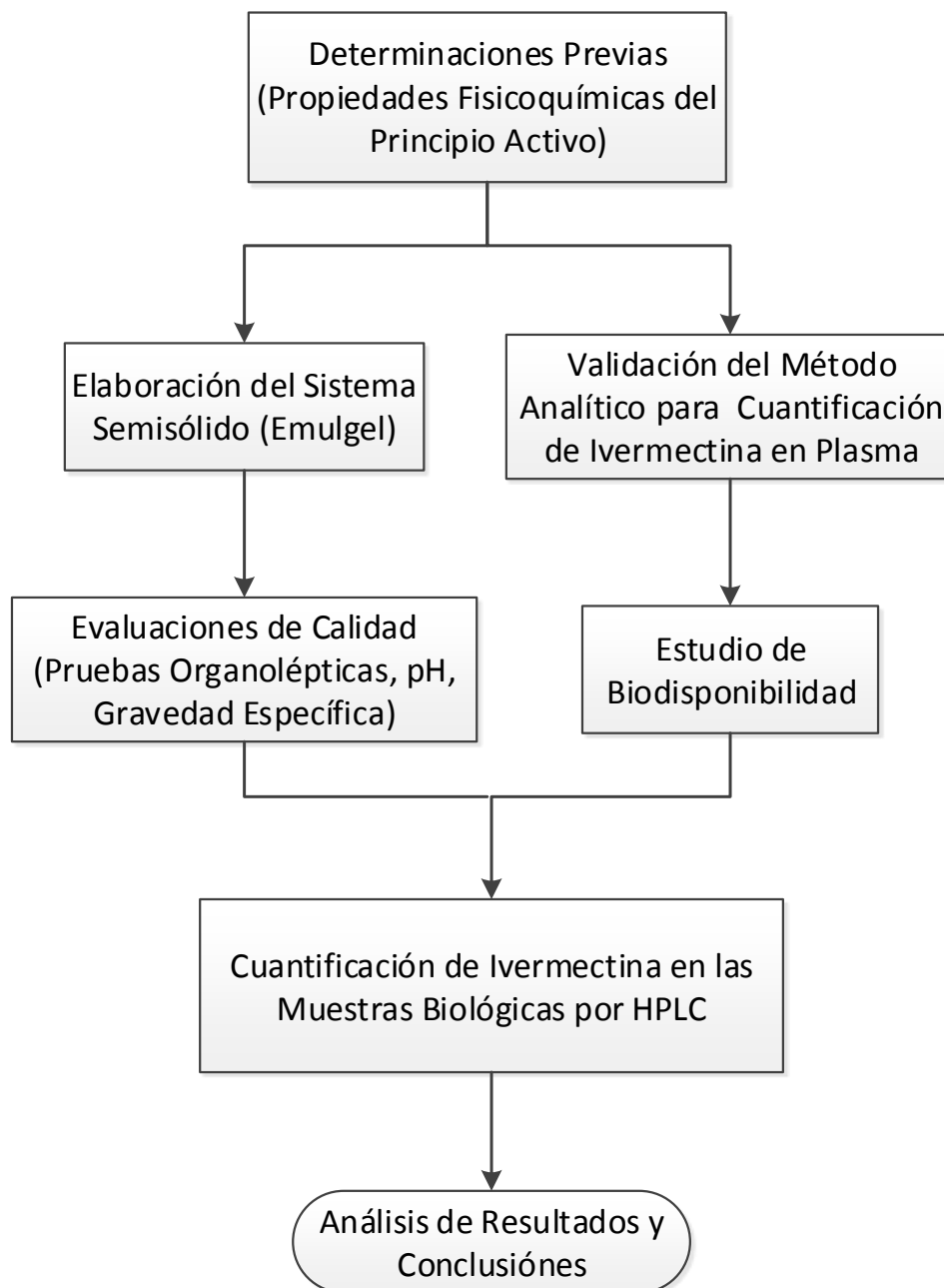


Figura 11. Diagrama de Flujo Experimental del Plan Experimental.

4.1. Material, equipos e instrumentos.

4.1.1. Material.

- ◆ Guantes de nitrilo
- ◆ Agitador de Plástico
- ◆ Barra Magnética
- ◆ Propela de agitación dentada y turbina
- ◆ Espátula
- ◆ Propipeta
- ◆ Membranas de filtración de Nylon de 0.22 y 0.45 micras
- ◆ Jeringa 10mL - aguja (21G x 38 mm)
- ◆ Tubos Vacutainer con heparina
- ◆ Tubos eppendorf de 2 mL
- ◆ Pipetas Pasteur con bulbos
- ◆ Pipetas volumétricas: 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 mL
- ◆ Matraces volumétricos: 2, 10, 50 y 100 mL
- ◆ Probeta graduada: 10, 500, 1000 mL
- ◆ Vasos de precipitados de vidrio: 10, 20, 50, 100, 500 y 1000 mL
- ◆ Vasos de precipitados metálicos de acero inoxidable 50, 100 y 250 mL
- ◆ Puntas de plástico para micropipetas
- ◆ Frascos de vidrio con tapa rosca de: 100 y 300 mL
- ◆ Botella de vidrio de: 500 y 1000 mL
- ◆ Gradillas para microtubos
- ◆ Gradilla para tubos de ensayo
- ◆ Viales para automuestreador 2 mL

4.1.2. Equipos e instrumentos.

- ◆ Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (Varian, ProStar), que consta de:
 - Sistema de bombeo (Varian ProStar, PS210, USA)
 - Detector UV-Visible (Varian ProStar, PS320, USA)
 - Automuestreador (Varian ProStar, PS400, USA)
- ◆ Espectrofotómetro (Varian, CARY 50 Conc, USA)
- ◆ Balanza analítica (BOECO, Alemania)
- ◆ Balanza granataria (OHAUS, USA)

- ◆ Agitador vórtex (IKA, Alemania)
- ◆ Micropipeta volumen variable 100-1000 µL (Brand, Alemania)
- ◆ Micropipeta volumen variable 20-200 µL (Brand, Alemania)
- ◆ Microcentrifuga (HETTICH, EBA12, Alemania)
- ◆ Potenciómetro (OAKTON, pH700, USA)
- ◆ Ultrasonificador (Branson, 5210, USA)
- ◆ Parrilla eléctrica con agitación (IKA, C MAGHS 7, Alemania)
- ◆ Agitador de velocidad variable (IKA, RW 20, Alemania)
- ◆ Sistema de purificación de agua de alta pureza (MerckMillipore, Milli-Q, USA)
- ◆ Sistema de purificación de agua (MerckMillipore, ELIX, USA)
- ◆ Congelador y Refrigerador

4.1.3. Reactivos.

- ◆ Ivermectina (Globe Chemical, S.A. de C.V.)
- ◆ Carbopol 940 (Ácido poliacrílico) (Noveon, México)
- ◆ Glicerina (Droguería Cosmopolita, México)
- ◆ Pluronic® F68 (Sigma, USA)
- ◆ Aceite Captex® 2000 (TCM)
- ◆ Transcutol® (Dietilenglicol monoetil éter) (Gattefossé, Francia)
- ◆ Trietanolamina (Baker, México)
- ◆ Metanol (Grado analítico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- ◆ Metanol (Grado cromatográfico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- ◆ Acetonitrilo (Grado cromatográfico Fermont, Productos Químicos Monterrey, México)
- ◆ Agua de alta pureza (MerckMillipore, Milli-Q, USA)

4.2. Preparación de Soluciones.

i. Solución de referencia de Ivermectina de 2.5 mg/mL (solución A).

Pesar aproximadamente y con exactitud 625.0 mg sustancia de referencia de Ivermectina y transferirlos a un matraz volumétrico de 250 mL, agregar 20 mL de metanol grado reactivo y sonicar durante 5 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con el mismo disolvente.

ii. Solución de referencia de Ivermectina para Curva de Calibración (solución B).

Utilizando pipetas volumétricas tomar una alícuota de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8 mL de la solución A de Ivermectina (2.5 mg/mL) transferir cada volumen a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico, para obtener las concentraciones de 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750, y 2000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

iii. Solución de referencia de Ivermectina Control de Calidad (200, 400 y 800 $\mu\text{g/mL}$).

Utilizando pipetas volumétricas tomar una alícuota de 2, 4 y 8 mL de la solución A de Ivermectina (2.5 mg/mL) transferir cada volumen a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico, para obtener las concentraciones de 200, 400 y 800 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

iv. Solución de referencia de Ivermectina para Estabilidad (300 y 600 $\mu\text{g/mL}$).

Utilizando pipetas volumétricas tomar una alícuota de 3 y 6 mL de la solución A de Ivermectina (2.5 mg/mL) transferir cada volumen a un matraz volumétrico de 25 mL y llevar a volumen con metanol grado cromatográfico, para obtener las concentraciones de 300 y 600 ($\mu\text{g/mL}$), respectivamente.

V. METODOLOGÍA

5.1. Determinaciones previas.

En la tabla 2 se muestra la formulación propuesta para la elaboración del emulgel de ivermectina:

Tabla 2 Formulación del emulgel de Ivermectina.

Emulsión		% p/p
Ivermectina (IVM)		0.5
Triglicérido de cadena media		27.6
Poloxámero		5.0
Agente promotor de permeación		10.0
Neutralizante		1.1
Gel c.b.p		
Carbómero	8.26	
Glicerina	58.68	100.0
Agua c.b.p	100.00	

5.1.1. Elaboración del emulgel.

La formulación propuesta para el emulgel se preparó de acuerdo a lo explicado por M. Gomez (2009), donde a continuación se describe su preparación (Figura No 12):

a) Fase Oleosa

Se disolvió la ivermectina en triglicéridos de cadena media agitando con una barra magnética a una temperatura de 45 °C hasta su disolución (30-45 min).

b) Fase acuosa

Se colocaron 10 g de Carbómero en 100 mL de agua destilada y se dejaron humectar por 24 h. Transcurrido el tiempo se homogenizó con un agitador de velocidad variable con una propela tipo serrata para la formación del gel.

Posteriormente, en un vaso de precipitados metálico de 250 mL se mezclaron el gel de Carbómero, la glicerina y el agua destilada, para la obtención de un gel bioadhesivo que es el que le confiere esta propiedad al emulgel.

Se pesó la cantidad necesaria de gel bioadhesivo previamente preparado y se agregó el Poloxámero, el cual se encontraba disuelto con anterioridad en la mínima cantidad de agua destilada, se homogeneizó nuevamente con agitador de velocidad variable y se agregó a continuación el Agente promotor de permeación, agitando la solución y calentando a 45 °C. Finalmente se adiciono la Neutralizante.

c) Formación del emulgel

Se mantuvo la fase acuosa con agitación y se fue adicionando poco a poco la fase oleosa, hasta su incorporación total (ambas fases estaban a 40 °C). Se continua la agitación hasta temperatura ambiente.

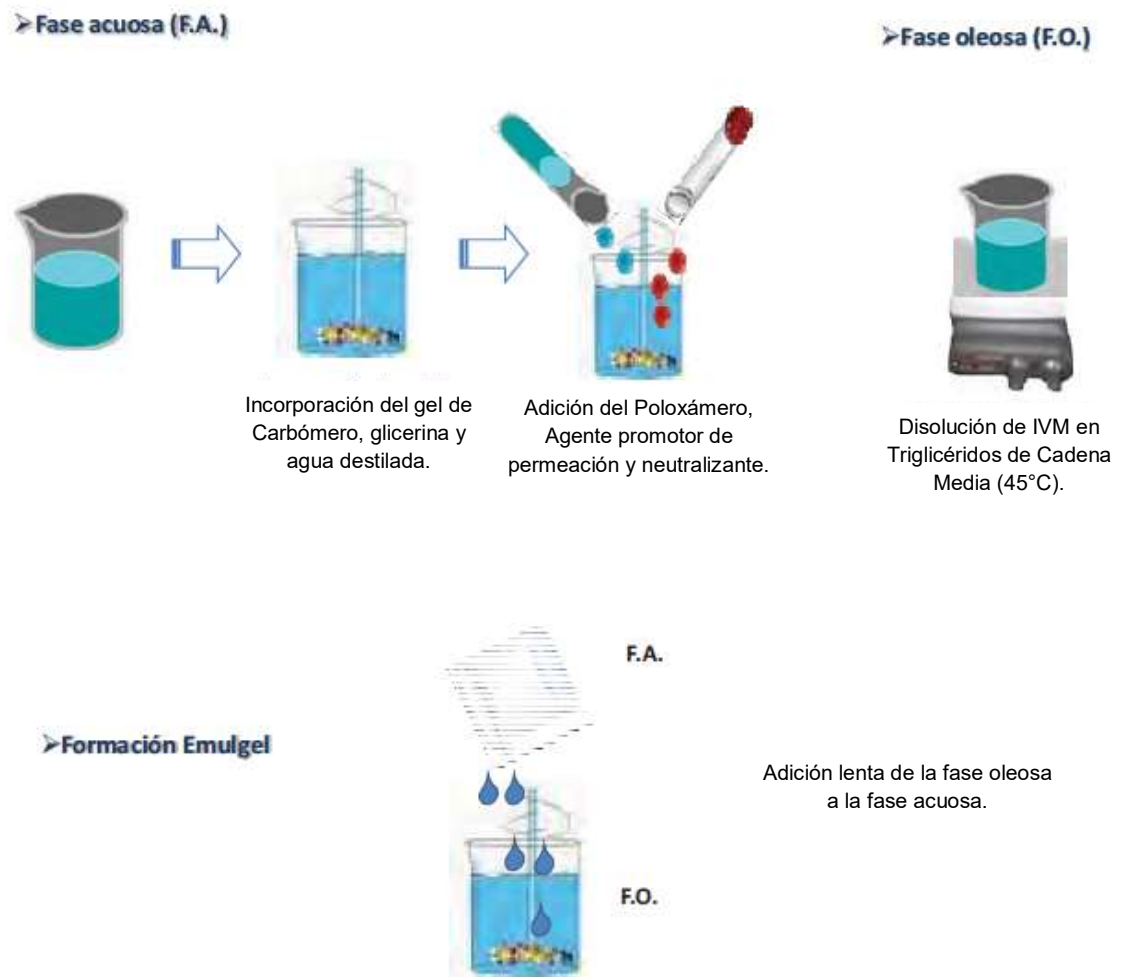


Figura 12. Esquema de la preparación del emulgel.

5.1.2. Evaluaciones al emulgel.

a) Color, olor, textura y consistencia del sistema semisólido.

Se observaron las muestras por un periodo de tres semanas. Tomando en cuenta propiedades físicas como: color, olor, textura y consistencia. Se realiza una extensión de una muestra del emulgel sobre un portaobjetos y se sitúa éste encima de una superficie negra, procediendo a su visualización mediante una lupa.

b) pH

Se midió el pH con el potenciómetro calibrado con un buffer de fosfatos (pH=7.0), leyendo directamente sobre las muestras que se encontraban a temperatura ambiente. La prueba se realizó por un periodo de 3 semanas, efectuando 3 mediciones cada semana.

c) Gravedad específica

La gravedad específica se determinó utilizando un picnómetro metálico, estas determinaciones se realizaron por un periodo de 3 semanas, efectuando 3 determinaciones cada semana.

5.2. Desarrollo del método analítico.

La premisa en el desarrollo de cualquier método analítico, consta en identificar el tipo y condiciones del detector, condiciones cromatográficas y un método de extracción para las muestras en plasma. Antes de comenzar con la parte experimental se revisaron las propiedades fisicoquímicas del analito: solubilidad, pka y características de la molécula, así como la concentración plasmática máxima esperada para poder proponer un intervalo de trabajo.

Se decidió emplear plasma en la cuantificación de ivermectina, ya que se consideró de más fácil obtención que la orina y las heces, además de que está posee una alta afinidad hacia proteínas plasmáticas. Debido a que, el plasma es una matriz biológica que contiene elevadas cantidades de sustancias endógenas como proteínas, lípidos, carbohidratos, etc., es necesario establecer un método de procesamiento de la muestra que permita la limpieza de la muestra para evitar posibles interferencias al tiempo de retención del analito de interés, bajo una metodología reproducible.

5.2.1. Condiciones cromatográficas.

- a) **Condiciones del detector.** Espectros de Absorción: Se determinaron las longitudes de onda (λ) de máxima absorción para una solución de ivermectina 100.0 $\mu\text{g/mL}$ en metanol. Los barridos se hicieron de 200 a 500 nm.

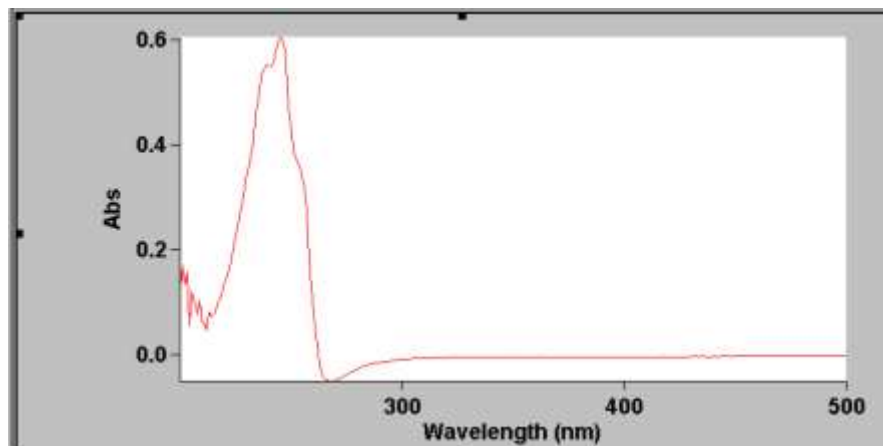


Figura 13. Espectrograma UV-Vis de máximos y mínimos de longitud de onda (λ)

- b) **Elección de la columna cromatográfica.** Se probaron las siguientes columnas cromatográficas:
- ❖ Columna Zorbax SB C18 4.6 x 250 mm 5 μm .
 - ❖ Columna Xterra SB C18 4.6 x 150 mm 5 μm .
 - ❖ Columna Zorbax SB C18 4.6 x 100 mm 5 μm .
 - ❖ LiChroCART® 125-4 LiChrospher® 100 RP-18 5 μm
- c) **Elección de la fase móvil.** Se probó la mezcla de solventes de Acetonitrilo (ACN): Metanol (MeOH): Agua, modificando la proporción de los solventes. La elección de la fase móvil se enfocó en aquella que nos proporcionara una resolución aceptable entre el pico de interés y las interferencias, así como los mejores parámetros cromatográficos de simetría y menor tiempo de retención posible además de presentar valores adecuados de simetría de pico y platos teóricos, con el menor tiempo de corrida posible.
- d) **Volumen de inyección y velocidad de flujo.** Se evaluaron volúmenes de inyección de 10 a 50 μL y un rango en la velocidad de flujo de 1.0 a 1.5 mL/min. Las elecciones de estos parámetros fueron establecidas eligiendo aquél que no provocara un cambio elevado en la presión y una buena resolución entre picos.

5.2.2. Método de extracción.

Para el procesamiento de extracción de ivermectina en plasma, se encontraron diversos métodos de extracción reportados, como la extracción líquido- líquido, precipitación de proteínas y extracción solido-líquida, etc. Sin embargo, durante el desarrollo se probó la técnica de precipitación de proteínas. En la Figura 14 se presenta un esquema general de la forma en que se abordó dicha técnica; mientras que como agentes precipitantes se probaron acetonitrilo y metanol

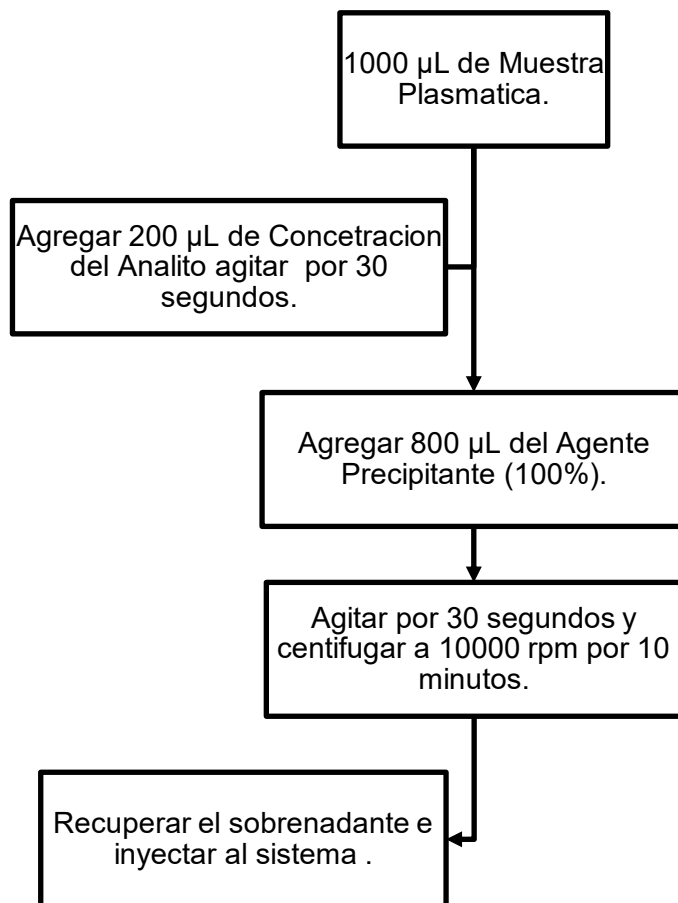


Figura 14. Esquema de la técnica por precipitación de proteínas.

5.2.3. Selectividad del método, Límite de Cuantificación y Detección.

Se prepararon por sextuplicado, muestras de ivermectina en plasma a la concentración más baja del intervalo de trabajo (25 µg/mL), las cuales fueron procesadas con el método ya establecido.

Se calculó el coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta. El límite de cuantificación (LC) es la concentración más baja del rango de trabajo cuyo valor promedio

no debe desviarse más del 20% del valor nominal, con un Coeficiente de Variación (C.V.) menor o igual a 20%.

La selectividad del método fue determinada analizando las muestras de plasma provenientes de seis animales sanos diferentes, sometiénolas al método de extracción. Se consideró que el método analítico era selectivo si en las muestras plasmáticas no se presentaba interferencia alguna en el tiempo de retención de ivermectina; en caso de presentarse, estas no deben poseer una respuesta mayor al 20 % del límite de cuantificación de ivermectina.

Se evaluó la selectividad del método en muestras plasmáticas conteniendo fármacos de uso común como anticoagulante heparina (143 unidades USP). Evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de ivermectina.

Además, se realizó una prueba para el caso en el que durante el estudio se presentaran muestras con plasma hemolizado y/o lipídico, para ello se prepararon por duplicado blancos con plasma hemolizado y lipídico, sometiénose a la técnica de extracción. Las muestras no debían presentar interferencia en los tiempos de retención de ivermectina; en caso de presentarse estas no deben poseer una respuesta mayor al 20 % del límite de cuantificación de ivermectina.

5.2.4. Preparación de la curva de calibración y puntos control en plasma.

Se prepararon cada uno de los puntos de la curva de calibración y puntos control tal y como se muestra en la Tabla 3. Las alícuotas indicadas se depositaron en microtubos de 2 mL a estas se les agregaron 1000 µL de plasma a cada tubo para completar el volumen de 2 mL y se agitaron en vortex durante 30 segundos. El rango para el desarrollo y validación del método bioanalítico fue de 25 µg/mL a 200 µg/mL.

Tabla 3 Preparación de la curva de calibración y muestras control de calidad.

Volumen Solución A Ivermectina 2500 µg/mL (mL)	Volumen Final (mL)	Concentración Ivermectina B (µg/mL)	Volumen Solución B Ivermectina (µL)	Volumen de metanol (µL)	Volumen de Plasma (µL)	Concentración Final Ivermectina (µg/mL)
1	10	250	200	800	1000	25*
2	10	500	200	800	1000	50
3	10	750	200	800	1000	75*
4	10	1000	200	800	1000	100
5	10	1250	200	800	1000	125
6	10	1500	200	800	1000	150*
7	10	1750	200	800	1000	175
8	10	2000	200	800	1000	200
2	25	200	200	300	500	40**
4	25	400	200	300	500	80**
8	25	800	200	300	500	160**
3	25	300	200	800	1000	30***
6	25	600	500	500	1000	150***

***Muestras Control de Calidad **Muestras de Precisión del Método**

***** Muestras de estabilidad**

5.2.5. Linealidad.

Se prepararon seis curvas de calibración a partir de pesadas independientes en cinco días diferentes, contemplando las concentraciones de 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, y 200 µg/mL, tal y como se describe en la Tabla 3 y posteriormente se procesaron de acuerdo al método de extracción desarrollado. La relación entre la respuesta cromatográfica con respecto a la concentración en cada curva de calibración, fue ajustado a través de una regresión lineal por mínimos cuadrados de la ecuación $y = mx + b$, donde la variable "y" es la relación de áreas entre ivermectina y el estándar interno obtenida para la concentración nominal.

Se consideró que el método cumplía con este parámetro, si al realizar el ajuste en cada una de las cinco curvas se obtenía un coeficiente de correlación lineal (r^2) mayor o igual a 0.98

y la desviación porcentual de la concentración recuperada (interpolada) con respecto a la nominal (adicionada) era menor o igual al $\pm 15\%$ en todos los puntos que constituyen la curva de calibración, a excepción del límite de cuantificación cuya desviación no debía superar al $\pm 20\%$.

5.2.6. Precisión del método.

a) Repetibilidad

A partir de una solución de referencia se prepararon y cuantificaron por sextuplicado, muestras plasmáticas con ivermectina a las concentraciones 25, 75 y 150 $\mu\text{g/mL}$, éstas se procesaron con el método ya mencionado, las cuales no pertenecen a la curva, pero se encuentran dentro del intervalo de concentraciones establecido.

Con los resultados obtenidos se determinó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de la concentración recuperada para las determinaciones de cada concentración. El coeficiente de variación no debe ser mayor al $\pm 15\%$.

b) Reproducibilidad

Se evaluó únicamente la reproducibilidad entre días del método. Para evaluar la reproducibilidad entre días se preparó una curva de calibración con muestras control de calidad (40, 80 y 160 $\mu\text{g/mL}$) por triplicado, durante tres días diferentes y dos analistas diferentes por día, empleando cada día una solución de referencia recién preparada.

Se calculó el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de los puntos de control de calidad empleando la concentración recuperada, para cada día. El coeficiente de variación global no debe ser mayor al $\pm 15\%$ en cada nivel de concentración.

5.2.7. Exactitud del método.

La exactitud se evaluó a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, determinando la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones obtenidas en cada nivel, con respecto a la concentración nominal de la muestra. El valor promedio en cada nivel de concentración de las muestras control de calidad durante las pruebas realizadas para evaluar repetibilidad y reproducibilidad, debieron estar dentro del $\pm 15\%$ de su valor nominal correspondiente, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Desviación absoluta} = \left(\frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración nominal}} \right) \times 100$$

5.2.8. Recuperación absoluta (% recobro).

Se prepararon por sextuplicado las muestras control de calidad de ivermectina en plasma (25, 75 y 125 µg/mL), se compararon sus respuestas cromatográficas (área de pico) promedio obtenidas después de aplicar la técnica de extracción en el fluido biológico contra la respuesta obtenida en muestras en solución preparadas a concentraciones equivalentes, las cuales no fueron sometidas al proceso de extracción (muestras para evaluación del sistema). El recobro no necesariamente debía ser del 100%, pero si debe ser constante en los tres niveles de concentración evaluados.

5.2.9. Estabilidad.

Se realizó esta prueba para determinar las condiciones de temperatura y tiempo, bajo las cuales ivermectina es estable en plasma, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, esta prueba se realizó evaluando la concentración recuperada del compuesto por analizar en la matriz biológica.

Se evaluó la estabilidad en plasma bajo las siguientes condiciones:

- a) Estabilidad de la muestra procesada y temperatura ambiente. Se prepararon por triplicado una serie de muestras plasmáticas correspondientes a los puntos de control de calidad (30 y 150 µg/mL) de ivermectina, almacenándose a temperatura ambiente. Dicha serie se procesó a las 9 y 24 h con el método.
- b) Estabilidad en refrigeración. Se prepararon por triplicado una serie de muestras plasmáticas correspondientes a los puntos de control de calidad (30 y 150 µg/mL) de ivermectina, y se almacenaron en refrigeración. Dicha serie se procesó al transcurrir 24 y 72 h con el método.
- c) Estabilidad ciclos congelación-descongelación. Se prepararon por triplicado dos series de muestras plasmáticas correspondientes a los puntos de control de (30 y 150 µg/mL) de ivermectina, y se almacenaron en el congelador (-20°C) dejando las muestras un periodo mínimo de 24 horas a -20°C entre cada ciclo. Todas las fracciones se descongelaron a las 24 y 48h posteriores a su preparación y en cada uno de los tiempos tres muestras de cada nivel de concentración fueron cuantificadas y el resto se congelaron nuevamente a -20°C; de esta manera se cumplen los dos ciclos con diferencias de por lo menos 24 h entre las descongelaciones. Se procesó una serie cada día con el fin de evaluar dos ciclos de congelación-descongelación con el método.

En todos los casos las muestras debían presentar un C.V. menor al $\pm 15\%$ y se considera que el compuesto de interés es estable bajo la condición evaluada si la desviación absoluta es menor al $\pm 15\%$ al ser comparadas con muestras control a la misma concentración preparadas recientemente.

5.3. Aplicación del método analítico en un estudio piloto de biodisponibilidad.

El trabajo experimental se desarrolló en colaboración con el laboratorio de Parasitología de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo-4 y los corrales del posgrado ubicados en el Centro de Enseñanza Agropecuaria ubicada en la carretera Cuautitlán–Teoloyucan Km 2.5 San Sebastián Xhala, Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Seis cachorros de dos meses de edad, criollos de una camada y sexo indistinto se alojaron en jaulas metálicas individuales de 90 x 40 x 60 cm con piso de malla rectangular de 1.4 x 11 cm y paredes de 2 x 3 y 13 x 2 cm respectivamente, que permiten la eliminación adecuada de las heces y orina (diseñadas para alojar a esta especie) cubriendo las especificaciones marcadas por la NOM-062-ZOO-1999 apartado 5.3.1.2, dotados de un comedero y un bebedero, estas jaulas cuentan con charolas inferiores que permiten la recolección de las heces y orina. También se les suministrará alimento y agua *ad libitum* cubriendo las especificaciones marcadas por la norma NOM-062-ZOO-1999 apartado 5.3.1.4.1 y apartado 5.3.1.4.2; el área destinada al mantenimiento de los perros está situada en el área de corrales de posgrado en el Centro de Enseñanza Agropecuaria de la Facultad donde se habilitó una zona propicia para el mantenimiento de caninos y felinos, delimitándola por medio de láminas metálicas en su perímetro y un techo adicional al ya existente en este sitio también a base de láminas. Cuenta con instalación hidráulica, eléctrica y drenaje.

Los perros después de finalizar la parte experimental biológica, (aproximadamente tres meses) se sacrificaron empleando una sobredosis de pentobarbital sódico (200 mg/kg) y enviados en bolsas amarillas a cremación en el área respectiva de la Sección de Ciencias Morfológicas, del mismo modo ocurrió con los remanentes de estos, cómo lo marca la norma NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

5.3.1. Análisis de las muestras plasmáticas.

Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos vacutainer heparinizados, en un lapso de (tiempo 0), 6, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120 y 144 horas después del

tratamiento, posteriormente las muestras de sangre fueron centrifugadas a 5000 rpm por 15 minutos y el plasma es recuperado, almacenado en viales y congelado a -20°C hasta su análisis.

Se realizó el análisis de un número significativo de muestras correspondientes a 6 sujetos experimentales, las cuales fueron procesadas y cuantificadas utilizando el método de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detector de UV previamente desarrollado y validado. Cada día de análisis se comprobó que no existieran interferencias en el pico de interés con la matriz biológica utilizada (blanco de plasma), al igual que el blanco de reactivos.

Las muestras del estudio se analizaron junto con una curva de calibración y puntos control de calidad de ivermectina. Para evaluar la validez de la corrida analítica se demostró la consistencia de las curvas de calibración con respecto a la pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación lineal en cada día de análisis, las muestras de los puntos control de calidad deben cumplir con los criterios de precisión y exactitud establecidos en la validación del método.

5.3.2. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos.

Los parámetros farmacocinéticos fueron determinados a través de métodos no compartimentales (modelo independiente), considerando los siguientes parámetros:

- a) C_{max} : Concentración plasmática máxima obtenida de manera gráfica, a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.
- b) T_{max} : Tiempo transcurrido desde la administración hasta que se produce la concentración plasmática máxima, obtenido de manera gráfica a partir del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo.
- c) ABC_{0-t} : Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración hasta el tiempo t (último tiempo de muestreo) calculada por el método trapezoidal. El procedimiento para el cálculo de este parámetro se describe en la siguiente fórmula:
- d) $ABC_{0-\text{inf}}$: Área bajo la curva de la concentración plasmática desde la administración al tiempo extrapolado al infinito.

- e) K_e : Constante de eliminación, se estima a partir de la porción lineal terminal del perfil de concentración plasmática con respecto al tiempo (en escala semilogarítmica).
- f) Vida media de eliminación: Mediante el cociente de $\ln(2) / K_e$
- g) $TMR_{0-\infty}$: Tiempo medio de residencia extrapolado a tiempo infinito
- h) $ABCM_{0-\infty}$: Área bajo la curva del primer momento extrapolado a tiempo infinito.

5.3.3. Aplicación del emulgel de ivermectina al 0.5% en perros con infección por *Ancliyostoma caninum* inducida

A tres perros de cuatro meses de edad y con un peso aproximado de 12 Kg se les indujo infección por *Ancliyostoma caninum* por vía oral con dosis única de 200 larvas activas.

Se practicaron tres muestreos previos al tratamiento (días 1, 3 y 4) de las heces determinando el número de huevos por gramo de muestra (h/g) por la técnica cuantitativa de McMaster. El tratamiento terapéutico consistió en aplicar el día 4 una cantidad suficiente de ivermectina en emulgel al 0.5%, analizando el número de huevos por gramo diariamente desde el día 5 (24 horas después del tratamiento) al 9. Los animales fueron posteriormente sacrificados, haciendo la necropsia correspondiente para determinar el contenido de parásitos presentes en el tracto gastrointestinal.

VI. RESULTADOS y DISCUSIÓN

6.1. Color, olor y apariencia de los sistemas semisólidos.

Es importante señalar que las características organolépticas son características físicas de una formulación o forma farmacéutica que confieren a ésta una apariencia, color, olor, textura, consistencia, los cuales son determinadas a través de los sentidos, únicas de cada producto. Se determinaron las características organolépticas del emulgel por periodo de tres semanas, obteniendo los resultados de la Tabla 4:

Tabla 4. Características del sistema semisólido Emulgel.

Característica	Emulgel Ivermectina
Color	Blanco Perlescente
Olor	Característico
Apariencia	Suave, Cremoso

La finalidad de evaluar dichas características es distinguir un cambio en las condiciones normales o propias de la formulación a través del tiempo, ya que esto manifiesta un probable cambio en sus propiedades físicas y químicas, mediante este ensayo se puede detectar la existencia de posibles burbujas de aire de ser numerosas, pueden producir la ruptura de sistema semisólido, ya que aumenta el gasto de emulgente y pueden producir un serio déficit del sistema emulsionante, no se observa cambios en las características del emulgel en el transcurso de las 3 semanas.

6.2. Potencial de hidrogeno (pH).

La determinación del pH es muy importante debidos a que, si se ubica por encima o por debajo del rango permitido se produce una alteración en el funcionamiento de la piel, propiciando con ello irritaciones. Además, influye también el estado de ionización de la molécula. En la Tabla 5 se observan los valores de pH obtenidos durante un periodo de 3 semanas. Los valores de la desviación estándar obtenidos para el pH del emulgel muestra que no hay una dispersión amplia entre los datos, lo cual nos dice que no hay un cambio en sus propiedades fisicoquímicas debido a que los polímeros que componen el emulgel dan lugar que sea dependiendo del pH del medio, para mejorar su estabilidad.

Tabla 5 Valores de pH obtenidos en el sistema semisólido Emulgel

Semana	1	2	3	Promedio Global/ D. E.
Promedio pH	7.30	7.25	7.28	7.28 / 0.03

Los efectos del pH son importantes para proporcionar buenas propiedades de bioadhesión a los sistemas semisólidos. A valores de pH alcalinos, no se pueden sintetizar lípidos esenciales de la epidermis, la piel pierde agua y se deshidrata. Las cadenas del polímero se encuentran sumamente hinchadas y se encuentran en una forma viscoelástica gomosa, lo cual permite la difusión y comunicación de la cadena con el tejido animal. En el caso del emulgel, se eligió un valor de pH neutro para poder aumentar la viscosidad del sistema al tener neutralizado el polímero, lo cual le ayudaría a mantener una buena estabilidad y mantener el manto ácido natural de la piel inhibiendo al mínimo los daños estructurales y fisiológicos de la piel.

6.3. Gravedad específica.

La determinación de la gravedad específica está basada en la relación del peso de la sustancia en el aire a 25°C con un volumen igual de agua a la misma temperatura, así mismo el volumen que ocupa la muestra y con ello saber el tipo de envase en el cual pudiera acondicionarse. La gravedad específica puede ayudar a conocer si ésta se puede mantener sin cambios en sus propiedades físicas y organolépticas durante su almacenamiento. De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 6, se observa que no existen cambios considerables en el valor de la gravedad específica para el emulgel, lo cual puede corroborarse con el valor de desviación estándar, dicho valor nos muestra la dispersión que existe entre los datos obtenidos durante el tiempo transcurrido.

Tabla 6. Valores de gravedad específica.

Semana	1	2	3	Promedio Global / D. E.
Promedio Gravedad Especifica	0.965	0.955	0.962	0.961 / 0.005

6.4. Desarrollo del método analítico.

Se realizó una búsqueda de las condiciones cromatográficas óptimas para la cuantificación de ivermectina en plasma, probando distintas columnas cromatográficas, cambiando la proporción de fase móvil, velocidad de flujo, volumen de inyección y condiciones de detección. Se tomaron en cuenta diferentes criterios para la elección de las mejores condiciones cromatográficas estos fueron:

- a. Sensibilidad.

- b. Resolución entre picos.
- c. Simetría de los picos.
- d. Eficiencia de la columna en la separación de los compuestos.
- e. Tiempo de retención del compuesto de interés dando por resultado una corrida breve.

6.4.1. Condiciones del detector.

Existen diversos procedimientos analíticos para la detección de ivermectina mediante el empleo de cromatografía líquida acoplado a detección de masas (Turnipseed et al.,2005), cartuchos de separación utilizando detector de masas (Yoshii et al.,2000) y fluorescencia (Gökhan Eraslan et al. 2010). Por lo general, el uso de estas técnicas como método de detección implica una preparación complicada de la muestra, con la utilización de complejos compuestos que demandan gran cantidad de tiempo en su elaboración.

El empleo de un detector de longitud de onda ultravioleta durante el desarrollo, validación y análisis de muestras de los diferentes sujetos experimentales (animales), bajo las condiciones establecidas fue de 245 nm; ya que bajo estas condiciones se obtiene una respuesta apropiada para ivermectina que no satura el sistema, además de tener una sensibilidad suficiente para la cuantificación del límite inferior. En estas condiciones además se presenta una menor cantidad de interferencias provenientes de la matriz biológica.

6.4.2. Columna cromatográfica.

De las columnas utilizadas se obtuvieron mejores resultados con la columna LiChrospher® 100 RP-18 (Prieto et al.,2003), ya que esta columna permitió obtener picos con buena simetría, lo cual nos asegura una adecuada integración y con ello una cuantificación confiable, la temperatura de columna utilizada fue de 25°C; la fase móvil para la cuantificación de ivermectina en plasma consistió en Acetonitrilo: Metanol: Agua en una proporción de 60:28:12 respectivamente.

6.4.3. Volumen de inyección, velocidad de flujo y fase móvil.

Se evaluaron volúmenes de inyección de 10 a 50 µL y un rango en la velocidad de flujo de 1.0 a 1.5 mL/min, sin embargo, las condiciones en donde se obtuvieron mejores resultados fueron utilizando un volumen de inyección de 10 µL, esta elección se debió a que a volumen de inyección grandes provocan la deformación del pico de interés esto se confirmó con el Boletín 826E de Sigma Aldrich (2009), y a una velocidad de flujo de 1.5 mL/min se debe

tener un flujo donde la presión se mantenga constante sin fluctuaciones, que favorezcan los parámetros cromatográficos del pico de interés, ya que bajo estas condiciones se obtuvo una buena resolución y simetría de los picos de interés, además de un tiempo de retención apropiada para el analito (Figura 15).

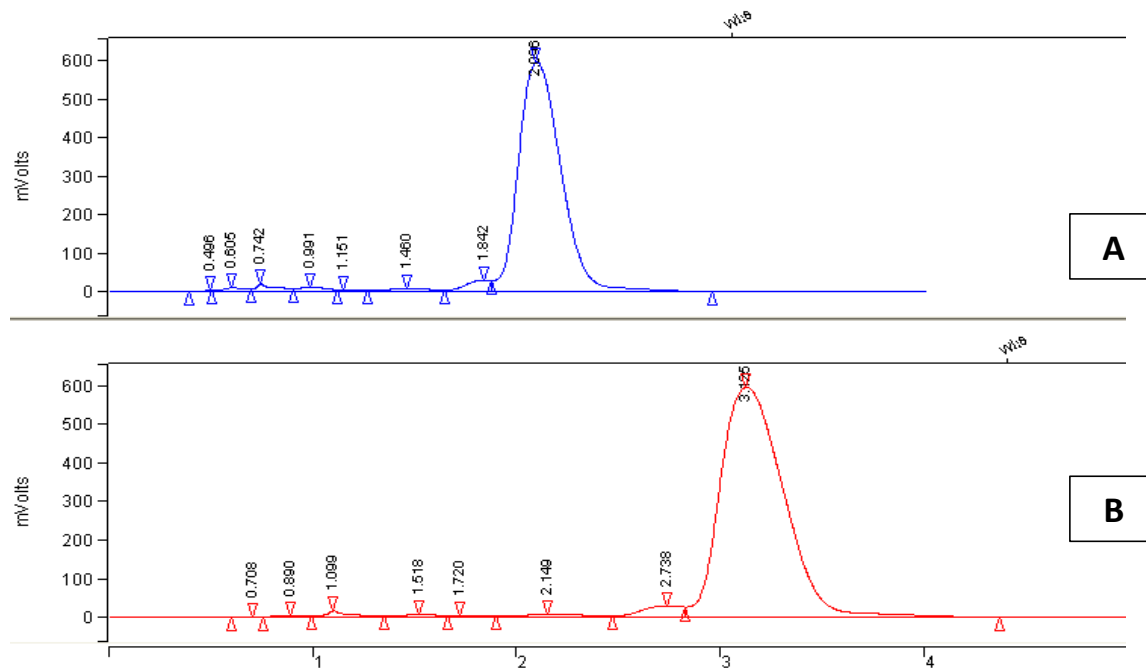


Figura 15. Cromatogramas. Selección de Fase Móvil y Velocidad de Flujo 1.5 mL/min (A) y 1.0 mL/min (B).

En los cromatogramas de la Figura 15 se puede observar que al utilizar una fase móvil en proporciones Acetonitrilo (ACN): Metanol (MeOH): Agua (60:35:5), se observan picos definidos, pero la separación entre ambos aún no está bien delimitada, por lo que se optó por emplear diferentes velocidades de flujo. En la Figura 15, con una velocidad de flujo de 1.5 mL/min se ve que se obtienen los picos en un menor tiempo. Sin embargo, se enciman los picos por lo que no hay una buena separación por parte de la fase móvil, y con una velocidad de flujo de 1.0 mL/min, los picos de separación comienzan a definirse, pero se consiguen en un mayor tiempo de corrida de la muestra.

Los cambios en las proporciones de la fase móvil se pueden distinguir en la Figura No.16 para mejor la respuesta y la separación de los picos, disminuyendo la cantidad de metanol y aumentando la proporción de acetonitrilo en el primer caso ACN:MeOH:Agua (75:20:5), en una segunda elección se disminuyó la cantidad de metanol y se aumentó la proporción de agua quedando de la siguiente manera ACN:MeOH:Agua (60:30:10). La fase móvil en CLAR generalmente consiste de agua o solución acuosa y un modificador orgánico, de este

depende la retención hidrofóbica del analito en la fase estacionaria, al añadir un disolvente orgánico disminuye la polaridad de la fase móvil y la distribución del analito se cambia hacia la misma, así conforme menos polar sea la fase móvil, menor será la adsorción de la muestra a la fase estacionaria (Snyder et al., 2011). Por consiguiente, la ivermectina es una molécula no polar, por lo que requiere una fase estacionaria más hidrofóbica, y así aumentar la resolución y selectividad de los picos presentes en el cromatograma.

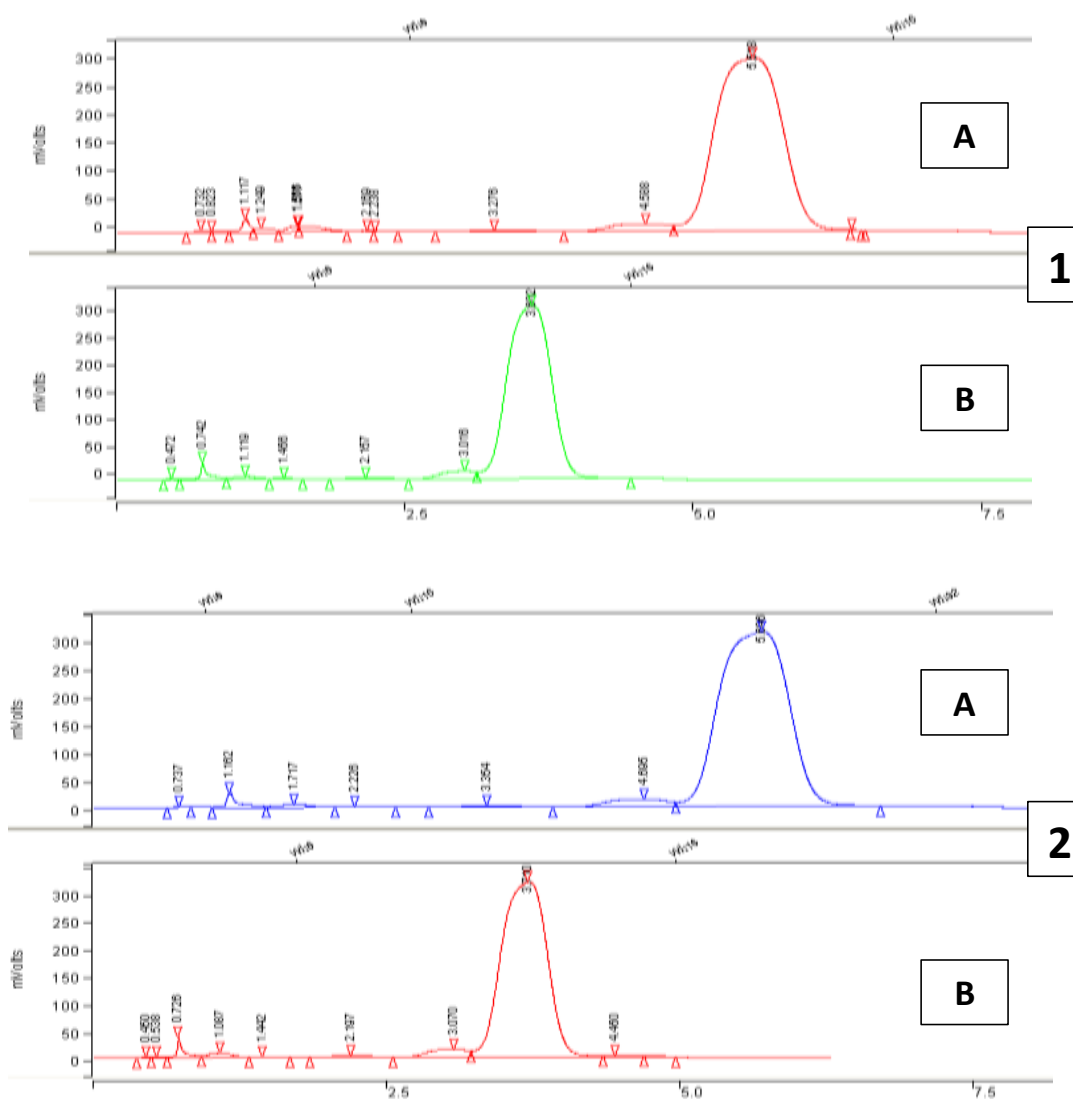


Figura 16. Cromatogramas. Variación de la fase móvil ACN: MeOH: Agua (75:20:5) (1) y (60:30:10) (2), Velocidad de flujo 1.0 mL/min (A) y 1.5mL/min (B).

Los resultados anteriores permiten establecer las condiciones cromatográficas del método analítico, con una velocidad de flujo de 1.5 mL/min utilizando una fase móvil con proporciones de ACN:MeOH:Agua (60:28:12) para así aumentar la separación de los picos.

Por último, como se puede ver en la Figura No.17, empleando las condiciones ya concretadas se somete a diversas longitudes de onda, distinguiéndose que la de mejor respuesta cromatográfica fue a 245 nm, donde se observan con mayor respuesta, resolución y asimetría en comparación con la de 254 nm. Para concluir en la Tabla 7, se establecen las condiciones cromatográficas que serán empleadas en el Método analítico para la cuantificación de ivermectina.

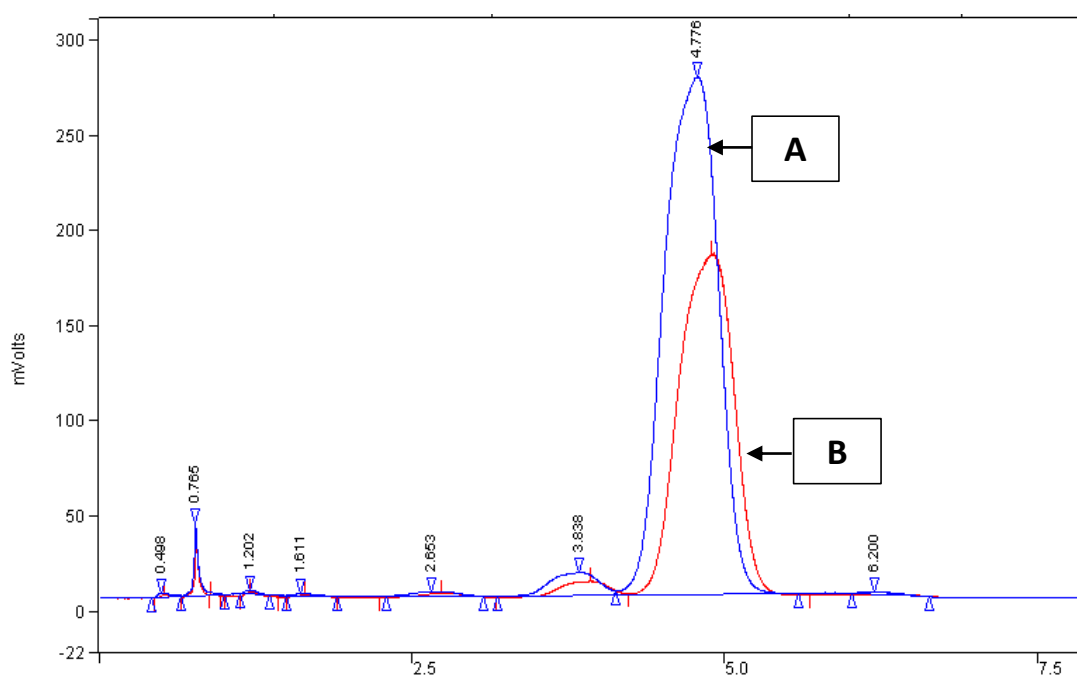


Figura 17. Selección de la Longitud de Onda 245 nm (A) y 254 nm (B)

Tabla No 7. Condiciones cromatográficas finales

Longitud onda	245nm
Columna	LiChrospher® 100 RP-18
Fase móvil	ACN:MeOH:Agua (60:28:12)
Velocidad de Flujo	1.5 mL/min
Volumen de inyección	10 µL

6.5. Método de extracción.

Para el procesamiento de extracción de ivermectina en plasma, se evaluó la técnica precipitación de proteínas, la cual se realizó utilizando los siguientes agentes precipitantes: acetonitrilo (100%), metanol (100%), se observó que el mejor agente precipitante a utilizar fue el metanol (100%), gracias a que presento menor cantidad de interferencias provenientes de la matriz biológica, además de tener un recobro mayor al 80% para el analito.

El método de extracción de ivermectina retenida en el plasma se describe a continuación en la Figura 18, en un tubo eppendorf de 2 mL se colocaron 1000 μ L de plasma a los cuales se les adicionó 500 μ L de una concentración de ivermectina en metanol, se agitó durante 30 segundos en el vortex y se centrifugó a 10000 rpm por 10 min se extrajo el sobrenadante empleando una pipeta pasteur y este se llevó al aforo a 2 mL, para ser analizadas por la técnica de CLAR.

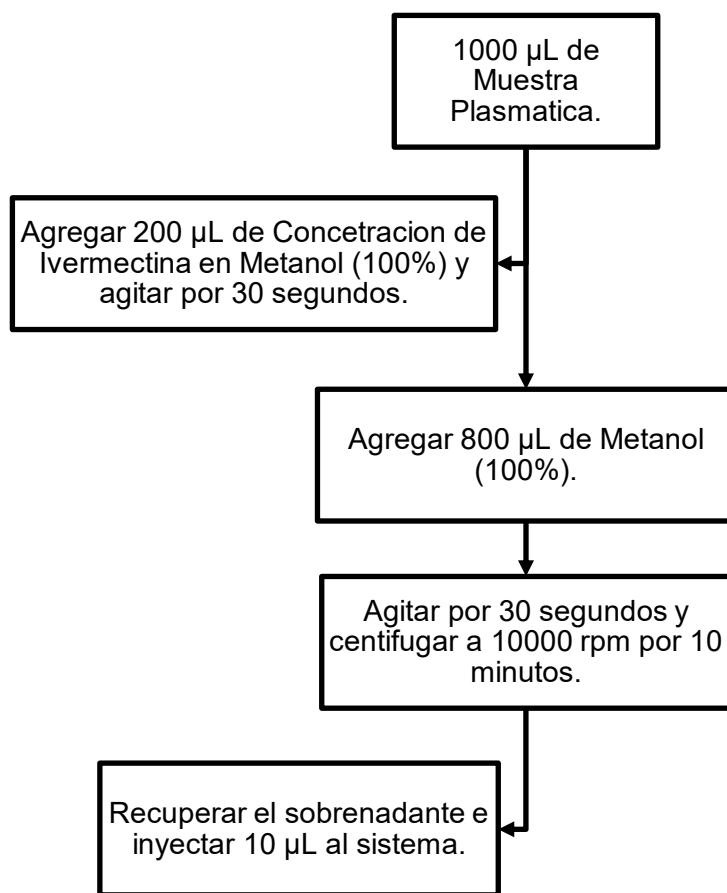


Figura 18. Esquema general de las técnicas por precipitación de proteínas.

Los solventes orgánicos miscibles con el agua como el metanol permiten la precipitación de proteínas, donde el principal efecto es la reducción del poder de solvatación del agua que se explica cómo la reducción de la constante dieléctrica del agua. con su estructura ordenada alrededor de los aminoácidos hidrofóbicos es desplazada por el solvente y la principal causa de agregación de las moléculas proteicas son las fuerzas electrostáticas y dipolares (Teijón et al., 2004).

La experimentación se realizó por sextuplicado, preparada como se explicó anteriormente se realizaron cada una de los parámetros de Validación como son: Linealidad, Selectividad, Exactitud, Precisión y Estabilidad.

6.6. Resultados de validación.

6.6.1. Validación del método analítico

Con el propósito de contar con un método analítico confiable para la cuantificación de ivermectina en plasma, éste se validó siguiendo las especificaciones y criterios de la Norma Oficial Mexicana 177-SSA1-1998, en el apartado 9. que se refiere a la validación de métodos analíticos para el análisis químico de muestras biológicas en pruebas de bioequivalencia.

6.6.2. Selectividad de inicio de corrida

Durante cada día de corrida en los días de validación se evaluó la selectividad inyectando un blanco de reactivos y un blanco de plasma, los cuales se analizaron a las condiciones cromatográficas establecidas, en ninguna corrida se presentaron interferencias en el tiempo de retención de ivermectina.

6.6.3. Selectividad del método y límite de cuantificación

La selectividad del método fue determinada, analizando la muestra blanco de la matriz biológica (muestras de plasma y su mezcla) y muestras de plasma conteniendo fármaco de uso común (anestésico) y el anticoagulante (Heparina 143 unidades USP), evaluando el método contra posibles interferencias en los tiempos de retención de ivermectina, también la posible interferencia de muestras hemolizadas y lipémicas.

El método mostró ser selectivo para los compuestos evaluados al no presentarse interferencias al tiempo de retención tanto de ivermectina. A continuación, en la Figura 19, se muestran los cromatogramas correspondientes a los blancos de plasma de los diferentes animales y la prueba de selectividad hacia fármacos de uso común.

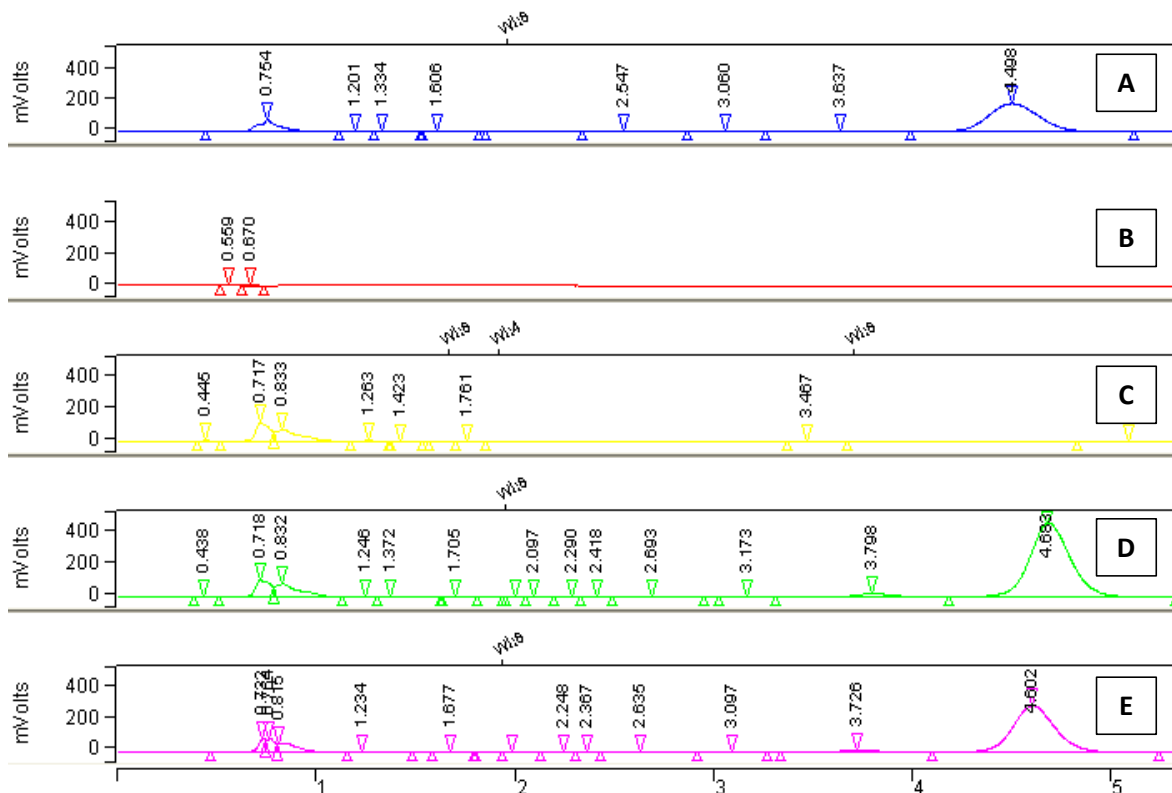


Figura 19. Selectividad del Método Cromatogramas representativos; A) Estándares de IVM en solución.; B) Blanco de reactivos (fase móvil); C) Blanco de plasma; D) LC de IVM en plasma y E) IVM en plasma hemolizado.

Las concentraciones promedio de 6 determinaciones independientes de ivermectina para el cálculo del límite de cuantificación se muestran a continuación en la Tabla 8, ambas tuvieron un coeficiente de variación no mayor al 20%, siendo así el método analítico capaz de determinar de manera precisa y exacta la concentración mínima cuantificable.

Tabla 8 Selectividad y límite de cuantificación del método analítico.

Concentración de ivermectina	Solución	Plasma		Plasma Hemolizado y/o Lipídico			
		Área	Tiempo Retención (min)	Área	Tiempo Retención (min)	Área	Tiempo Retención (min)
25.4		134069	4.539	186036	4.512	151124	4.469
		136887	4.553	152214	4.607	171723	4.489
		121229	4.559	162507	4.504	137225	4.489
		140378	4.524	155362	4.486	166681	4.485
		133934	4.546	163271	4.560	146584	4.585
		137604	4.622	157094	4.504	150701	4.522
Promedio		134016.83	4.56	162747.33	4.53	154006.33	4.51
D. E.		6709.82	0.0340	12166.74	0.0457	12887.71	0.0422
C. V.		5.007%	0.746%	7.476%	1.009%	8.368%	0.935%

Se evaluó el método ante posibles interferencias en los tiempos de retención de ivermectina, para esto se analizó el plasma de seis perros sanos por separado aplicando el método de extracción, para corroborar que no existieran interferencias con los analitos. Se muestran los cromatogramas representativos de los analitos en solución, blanco de plasma y de reactivos, así como la extracción del límite de cuantificación a partir del plasma; como se puede apreciar se obtuvo una cuantificación de ivermectina libre de interferencias. Además, se analizó la posibilidad de interferencias de sustancias endógenas como la hemoglobina.

6.6.4. Linealidad del Método.

Los resultados de la prueba de linealidad para las seis curvas de calibración en plasma, la relación entre la respuesta cromatográfica con respecto a la concentración en cada curva de calibración, fue ajustado a través de una regresión lineal a la ecuación $y = mx + b$, con ponderación donde la variable “y” es la respuesta analítica (de áreas de ivermectina) obtenida para su respectiva concentración nominal “x” de ivermectina. La linealidad del método fue definida a partir del coeficiente de correlación lineal (r^2), cuyo valor de

cumplimiento para cada curva de calibración fue de 0.99 o mayor, considerándose para esta evaluación las curvas de la validación del método analítico.

Se determinó la linealidad del sistema de ivermectina evaluando seis curvas de calibración en la matriz biológica (plasma) en un rango de 25 – 200 µg/mL de IVM en un mismo día, la respuesta se cuantificó midiendo el área de los picos, se graficó dicha respuesta versus la concentración de ivermectina en el intervalo mencionado, se determinó el coeficiente de correlación lineal (r^2), la pendiente (m), y la ordenada al origen (b) para cada curva de calibración.

Se reportan los datos de pendiente (b), ordenada al origen (a) y coeficiente de correlación para las 6 curvas de calibración graficando concentración nominal vs respuesta de áreas de ivermectina se pueden ver en la Tabla 9.

Tabla 9 Parámetros de Linealidad del Método para cuantificar Ivermectina en Plasma.

Concentración Teórica (µg/mL)	Concentración Real (µg/mL)	Promedio	D. E.	C. V.
25	25.12	2072090.0	65848.6	3.18%
50	50.24	4104025.7	110674.6	2.70%
75	75.36	6199213.0	23126.7	0.37%
100	100.48	8278393.3	135752.9	1.64%
125	125.6	10413874.3	38151.1	0.37%
150	150.72	12556919.7	143309.2	1.14%
175	175.84	14951008.7	137291.0	0.92%
200	200.96	16705600.0	175399.9	1.05%

m (pendiente)	84299
b (ordenada al origen)	- 119043
r (coeficiente de correlación)	0.9991

En la Figura 20 se observa el promedio de la respuesta de ivermectina una vez aplicado el método de extracción de ivermectina obtenida de las curvas de calibración en solución en un rango de concentraciones de 25 – 200 µg/mL, a su vez el promedio calculado. Al graficar el promedio de las áreas de ivermectina, se observó un comportamiento el cual fue descrito por la ecuación $y = 84299(X) - 119043$ con un coeficiente de correlación lineal de 0.9996, con dichos resultados el método de ivermectina cumple con el parámetro de linealidad.

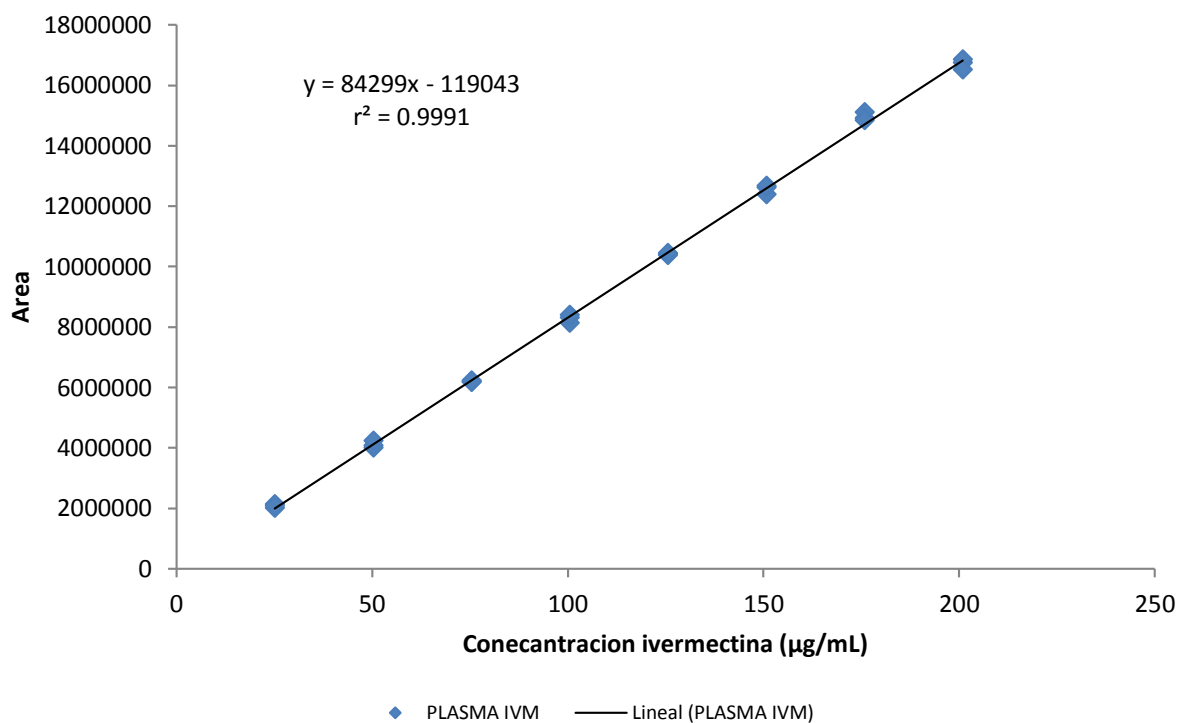


Figura 20. Gráfico de Linealidad del Método.

Debido a la saturación de la señal en el detector y sensibilidad requerida para la caracterización de los perfiles farmacocinéticos de ivermectina, el método analítico fue validado en el rango de 25 – 200 µg/mL de ivermectina.

La curva de calibración fue repetible en el intervalo de concentraciones de 25 – 200 µg/mL; todos los valores de coeficiente de correlación lineal obtenidos fueron mayores a 0.99. En cada punto de la curva de calibración se dio cumplimiento a los criterios establecidos para precisión y exactitud, es decir C.V% y desviación absoluta porcentual menor o igual al 15% respectivamente y 20% para el límite de cuantificación.

6.6.5. Precisión del método.

La repetibilidad del método para cuantificar ivermectina en plasma, se puede observar que el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración evaluados fue menor o igual que 4.22%, mientras que la desviación absoluta (D. Abs %) fue menor o igual que 7.688%, los resultados correspondientes se ilustran en la Tabla 10

Tabla 10 Repetibilidad del método analítico para cuantificar ivermectina en plasma.

Muestra	Concentración (µg/mL)		
	Baja (25)	Medio (75)	Alta (150)
1	25.474	68.213	146.869
2	25.411	71.313	145.643
3	25.220	69.002	143.543
4	24.853	68.511	142.519
5	26.982	68.511	141.030
6	27.580	69.853	146.869
Promedio	25.920	69.234	144.412
DE	1.093	1.170	2.423
C. V.	4.22%	1.69%	1.68%
D. Abs. %	3.680%	7.688%	3.725%

Se analizaron por sextuplicado, muestras en plasma de los tres niveles de concentración control a las cuales se les aplico el método de extracción antes descrito, para ivermectina se obtuvo un coeficiente de variación menor al 15% respecto al valor nominal, lo cual indica que existe poca variabilidad en los resultados obtenidos al aplicar el mismo método repetidas veces bajo las mismas condiciones analíticas (mismo analista, mismo día de trabajo, equipo y laboratorio) los datos se encuentran en la Tabla 10

El método es repetible ya que el coeficiente de variación obtenido de las seis concentraciones recuperadas en cada nivel de concentración es menor al $\pm 15\%$, lo cual indica que hay poca variabilidad en los resultados obtenidos al aplicar el método repetidas veces, bajo las mismas condiciones analíticas (mismo analista, mismo día de trabajo, equipo y laboratorio).

6.6.6. Reproducibilidad y exactitud del método.

Se realizaron determinaciones de las muestras control en tres días distintos y tres muestras de cada nivel mencionado por día, aplicando el método de extracción, el promedio de las concentraciones calculadas obtuvo un coeficiente de variación menor al 15% respecto a su concentración nominal de IVM, con lo que el método fue reproducible, los datos se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11 Reproducibilidad del método analítico para cuantificar ivermectina en plasma, en diferente día y analista.

Día	Analista	Concentración Real (µg/mL)	Concentración Estimada			Media	DE	C. V. (%)	ER (%)
1	A	40	35.73	35.66	35.89	35.76	0.119	0.33%	-10.59
		80	75.41	78.30	74.99	76.24	1.802	2.36%	-4.70
		160	141.11	137.65	131.65	136.80	4.786	3.50%	-14.50
	B	40	33.53	36.41	34.75	34.90	1.444	4.14%	-12.76
		80	78.78	82.56	82.09	81.14	2.063	2.54%	1.43
		160	145.42	146.00	141.13	144.18	2.659	1.84%	-9.89
2	A	40	38.74	38.14	36.42	37.77	1.204	3.19%	-5.58
		80	85.51	84.93	80.65	83.70	2.652	3.17%	4.62
		160	140.89	152.28	146.93	146.70	5.700	3.89%	-8.31
	B	40	33.53	36.41	34.75	34.90	1.444	4.14%	-12.76
		80	78.78	82.56	82.09	81.14	2.063	2.54%	1.43
		160	145.42	146.00	141.13	144.18	2.659	1.84%	-9.89
3	A	40	38.18	38.12	37.93	38.08	0.132	0.35%	-4.81
		80	78.21	77.33	79.46	78.34	1.069	1.37%	-2.08
		160	155.23	147.11	143.65	148.66	5.942	4.00%	-7.08
	B	40	36.21	36.15	37.11	36.49	0.540	1.48%	-8.77
		80	80.92	84.02	81.71	82.22	1.611	1.96%	2.77
		160	146.58	158.35	145.58	150.17	7.104	4.73%	-6.14

Los resultados de la reproducibilidad del método y exactitud interdía correspondiente, en donde se observa que el coeficiente de variación entre los diferentes días de trabajo fue de 0.0 a 5.0 %, mientras que la desviación absoluta (%) fue igual o menor a 20.0%, en las diferentes concentraciones evaluadas como se observa en la Tabla 11.

De acuerdo con los resultados de repetibilidad y reproducibilidad interdía, el método analítico cumple con el parámetro de exactitud ya que los resultados se encuentran dentro del rango de 85% - 115% de exactitud, cabe resaltar que con respecto al estudio entre analista se nota una diferencia, ya que algunos de los resultados son mayor del 15% en la desviación absoluta, por lo que se recomienda que para el analista se debe tener una mayor atención en el proceso de extracción del principio activo.

De acuerdo con los resultados generados, el método fue repetible, reproducible y exacto entre días al cumplir con los criterios de un coeficiente de variación y una desviación absoluta (%) no mayores al 15% para la concentración plasmática promedio.

6.6.7. Recobro.

El recobro fue definido como el cociente de la respuesta del analito, área de ivermectina obtenida después de aplicar la técnica de extracción en el fluido biológico, entre la respuesta obtenida en muestras en solución a concentraciones equivalentes, las cuales no fueron sometidas al proceso de extracción (muestras para evaluación del sistema).

Para el cálculo de recobro, se comparó la respuesta obtenida en el método contra la obtenida por sistema en solución, ya que esta última fue empleada como el 100%, el recobro absoluto obtenido para los analitos se muestra en la tabla 12, siendo en promedio de 106.5% para IVM, los resultados en los tres niveles de concentración control fueron consistentes para ambos analitos.

El recobro del método analítico para cuantificar ivermectina en plasma fue constante en las concentraciones evaluadas (puntos control bajo, medio y alto), dando como resultado un Recobro Absoluto del 106.491% y una desviación de los promedios individuales con respecto al global, menor al 15%. Los resultados se muestran en la Tabla No 12.

Tabla 12 Recobro absoluto del método analítico para cuantificar ivermectina en plasma

Concentración		Área		Concentración Real (µg/mL)	Recobro %
Nominal (µg/mL)	Real [µg/mL]	Sln.	Plasma		
25.0	25.8	158026.0	165248.0	27.0	104.6
		168010.0	165916.0	25.5	98.8
		163544.0	177786.0	28.0	108.7
Promedio		163193.3	169650.0	26.8	104.0
DE		5001.2	7053.9	1.3	5.0
C.V (%)		3.1	4.2	4.8	4.8
75.0	77.4	441964.0	460888.0	80.7	104.3
		464159.0	452308.0	75.4	97.4
		465987.0	465203.0	77.3	99.8
Promedio		457370.0	459466.3	77.8	100.5
DE		13373.3	6564.0	2.7	3.5
C.V (%)		2.9	1.4	3.5	3.5
125.0	129.0	754515.0	858656.0	146.8	113.8
		763122.0	912556.0	154.3	119.6
		820473.0	914379.0	143.8	111.4
Promedio		779370.0	895197.0	148.3	114.9
DE		35855.4	31658.6	5.4	4.2
C.V (%)		4.6	3.5	3.6	3.6
Promedio de Recobro Absoluto					106.5
DE					7.5
C.V (%)					7.0

6.6.8. Estabilidad.

Los resultados de la prueba de estabilidad para ivermectina se obtuvieron evaluando la concentración recuperada del compuesto en la matriz biológica con base en ello se tiene que determinar las condiciones de temperatura y tiempo en las que los compuestos de interés conservan sus características en la matriz biológica y en solución, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, las muestras se sometieron a diferentes condiciones.

Las muestras plasmáticas se sometieron a estabilidad de 9 a 24 horas a temperatura ambiente, bajo las condiciones en las que se mantendrán las muestras hasta su análisis, se eligieron dos niveles de concentración control de 30 y 150 µg/mL de Ivermectina preparándose por triplicado, posteriormente estos fueron comparados con muestras preparadas al instante sin ser sometidos a diferentes temperaturas.

Exponiendo que las concentraciones calculadas tuvieron un coeficiente de variación menor al 15% respecto a las concentraciones obtenidas de los puntos control no sometidos a estabilidad, con lo anterior mencionado la ivermectina conserva sus características durante un periodo de nueve horas a temperatura ambiente, resultados mostrados en la Tabla 13, en la cual se puede observar que la ivermectina fue estable en la solución de inyección durante 24 horas después de su preparación.

En la prueba de estabilidad de la muestra procesada conservada en el automuestreador a temperatura ambiente se encontró que las muestras son estables por un periodo de hasta 24 horas.

a) Temperatura ambiente (23-25°C) después de 24 horas.

Se puede observar en la Tabla 13 que las muestras son estables hasta 24 horas, ya que la mayoría de las muestras presentan una desviación absoluta menor a 15%, a excepción de un trascurso de 24 horas con una concentración de 150 µg/mL, presenta una exactitud de 75%, lo que indica que la ivermectina se une con mayor afinidad a las proteínas del plasma disminuyendo la cuantificación del analito mantenidas a temperatura ambiente se muestran.

Tabla 13. Estabilidad de ivermectina en plasma (temperatura ambiente y automuestreador de 23-25°C/ 24 h)

Horas	Concentración (µg/mL)	Concentración Real (µg/mL)			Promedio	DE	C. V.	% Exactitud	% D. Abs.
9	Bajo (30)	28.4	28.9	30.8	29.4	1.3	4.5%	97.9	2.1%
	Alto (150)	144.6	142.6	144.6	143.9	1.2	0.8%	95.9	4.1%
24	Bajo (30)	25.3	26.9	26.8	26.3	0.9	3.4%	87.7	12.3%
	Alto (150)	119.5	113.9	106.9	113.4	6.3	5.6%	75.6	24.4%
Frescos	Bajo (30)	33.0	30.8	33.3	32.4	1.3	4.1%	107.9	7.9%
	Alto (150)	153.2	153.4	153.6	153.4	0.2	0.1%	102.3	2.3%

b) Estabilidad en refrigeración (1-3°C) después de 24 horas. En la Tabla 14 se muestran los resultados del análisis de las muestras conservadas en refrigeración, estas se almacenaron en refrigeración demostrando que son estables durante 24 horas, ya que para todos los controles se presenta una desviación absoluta menor a 15% con respecto a los valores de las muestras de control de calidad recién preparadas, a excepción del transcurso de 24 horas, la cual presenta una exactitud menor del 85% en concentraciones bajas, demostrando que se deben utilizar antes de 24 horas de su preparación.

Tabla 14. Estabilidad de ivermectina en plasma (refrigeración de 1- 3 °C/ 24 h)

Horas	Concentración (µg/mL)	Concentración Real (µg/mL)			Promedio	DE	C. V.	% Exactitud	% D. Abs.
24	Bajo (30)	25.4	26.4	27.2	26.3	0.9	3.4%	87.8	12.2%
	Alto (150)	154.4	150.3	151.6	152.1	2.1	1.4%	101.4	1.4%
72	Bajo (30)	25.4	24.5	24.8	24.9	0.5	1.9%	83.0	17.0%
	Alto (150)	143.7	138.8	141.7	141.4	2.5	1.8%	94.3	5.7%
Frescos	Bajo (30)	29.1	28.9	27.7	28.6	0.7	2.6%	95.2	4.8%
	Alto (150)	159.6	157.5	159.4	158.8	1.2	0.7%	105.9	5.9%

c) Estabilidad ciclos congelación-descongelación (-20C). En la Tabla 15 se muestran los resultados del análisis de las muestras sometidas después de dos ciclos de congelación-descongelación. Como se puede observar la prueba cumple 2 ciclos de

congelación/descongelación al presentarse coeficientes de variación menores al 15% y presentar una diferencia no mayor al 15% con respecto al valor de referencia (muestras recién preparadas).

Tabla 15 Estabilidad de ivermectina en plasma (ciclos congelación-descongelación)

Horas	Concentración (µg/mL)	Concentración Real (µg/mL)			Promedio	DE	C. V.	% Exactitud	% D. Abs.
24	Bajo (30)	25.1	25.9	26.6	25.9	0.8	3.0%	86.3	13.7%
	Alto (150)	158.1	168.2	166.5	164.2	5.4	3.3%	109.5	9.5%
48	Bajo (30)	24.3	24.0	24.8	24.3	0.4	1.8%	81.2	18.9%
	Alto (150)	139.6	138.5	135.2	137.8	2.3	1.7%	91.9	8.2%
Frescos	Bajo (30)	27.3	27.2	28.2	27.6	0.5	2.0%	91.9	8.2%
	Alto (150)	168.0	171.0	174.3	171.1	3.1	1.8%	114.1	14.1%

Se analizaron muestras expuestas por un periodo de 2 días de congelación/descongelación, para determinar la estabilidad de IVM contenida en muestras plasmáticas, una vez transcurrido dicho tiempo se procesaron conforme al método analítico, los resultados cumplieron con la especificación de un coeficiente de variación menor al 15% respecto a las concentraciones obtenidas de las muestras no sometidas a estabilidad.

La estabilidad de las muestras preparadas, señala que en condiciones de análisis a temperatura ambiente de 25 °C y colocadas en el automuestreador deben ser inyectadas en un periodo menor de 24 horas. Por otro lado, en condiciones de refrigeración se recomienda utilizar la muestra en un periodo menor de 72 horas, en comparación con los ciclos de congelación y descongelación datos obtenidos, solo es conveniente un máximo de 2 ciclos para conservar una exactitud entre 85% - 115% de recobro del analito y evitar al máximo la interacción de las proteínas plasmáticas con la ivermectina y aumentar la eficacia en la cuantificación de la ivermectina.

6.7. Obtención de muestra biológica.

Se preparó un emulgel con una concentración al 0.5% (0.5 g/100 g) de ivermectina dos dosis fueron aplicadas cada 24 horas de 200 µg/Kg de peso del animal (Gökhan Eraslan et al. 2010). La administración se hizo en la parte dorsolumbar (*pour-on*) (Cunningham et al. 2010) del animal en un área de 10 cm², asegurando que el producto se extienda correctamente, posterior a la administración no se observan cambios de conducta en los animales experimentales.

6.7.1. Estadística descriptiva de los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo.

En la Tabla 16 se muestran los resultados obtenidos en la estadística descriptiva para los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo de ivermectina. El número de animales considerado para el análisis estadístico fue de 6 sujetos experimentales. Los datos individuales se muestran en el anexo 9.1.

Tabla 16 Estadística de los datos de concentración plasmática con respecto al tiempo.

Tiempo (horas)	n	Concentración Plasmática						
		Promedio ($\mu\text{g/mL}$)	D.E.	E.E.	Mínimo	Máximo	Mediana	% C.V.
0	6	0.000	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.00
6	6	1.726	0.33	0.135	1.462	2.309	1.595	19.16
12	6	1.856	0.28	0.113	1.637	2.374	1.761	14.96
20	6	2.233	0.23	0.092	1.982	2.541	2.195	10.09
28	6	3.328	0.72	0.295	2.252	4.231	3.572	21.73
36	6	3.792	0.79	0.323	2.515	4.525	3.957	20.84
48	6	3.128	0.67	0.272	2.264	4.014	3.075	21.28
60	6	2.470	0.50	0.202	1.802	3.301	2.470	20.06
72	6	2.204	0.45	0.184	1.768	3.001	2.141	20.49
96	6	2.035	0.47	0.191	1.604	2.918	1.895	22.98
120	6	1.755	0.19	0.078	1.550	2.118	1.727	10.86
144	6	1.570	0.03	0.013	1.543	1.616	1.557	2.00

6.7.2. Concentración plasmática promedio con respecto al tiempo (escala normal y semilogarítmica)

Con la finalidad de visualizar el comportamiento farmacocinético de ivermectina, se presentan las gráficas de concentración plasmática promedio con respecto al tiempo con un intervalo de confianza del 95% representados y un límite superior e inferior (Figuras 21 y 22). En el anexo 9.2, se presentan los perfiles farmacocinéticos para cada animal. En ambas gráficas, se observa una absorción constante durante la primera aplicación en un lapso de 24 horas, pero al administrar la segunda carga la absorción se ve modificada en

una aumento de velocidad de absorción por la acumulación de las ambas aplicaciones en la misma zona, esto debido a que, la solubilidad de la ivermectina en agua es limitada, precipita en los tejidos subcutáneos, por lo tanto el fármaco exhibe una tendencia al acumularse en tejido graso, debido a su carácter lipófilo, por lo que se determinó que el fármaco unido aumenta al tejido graso de la piel, provoca un aumento en concentración a la unión de proteínas plasmáticas (Lespine et al., 2009), logrando alcanzar en un lapso de 12 horas la concentración máxima (C_{máx}). Por otro lado, la eliminación lenta en un tiempo prolongado después de la administración transdérmica. Este comportamiento podría representar un comportamiento cercano a un modelo de dos compartimentos (González et al. 2007) e indica una absorción continua de manera que el fármaco se encuentra disponible en el plasma por más tiempo y en consecuencia aumenta el tiempo del efecto.

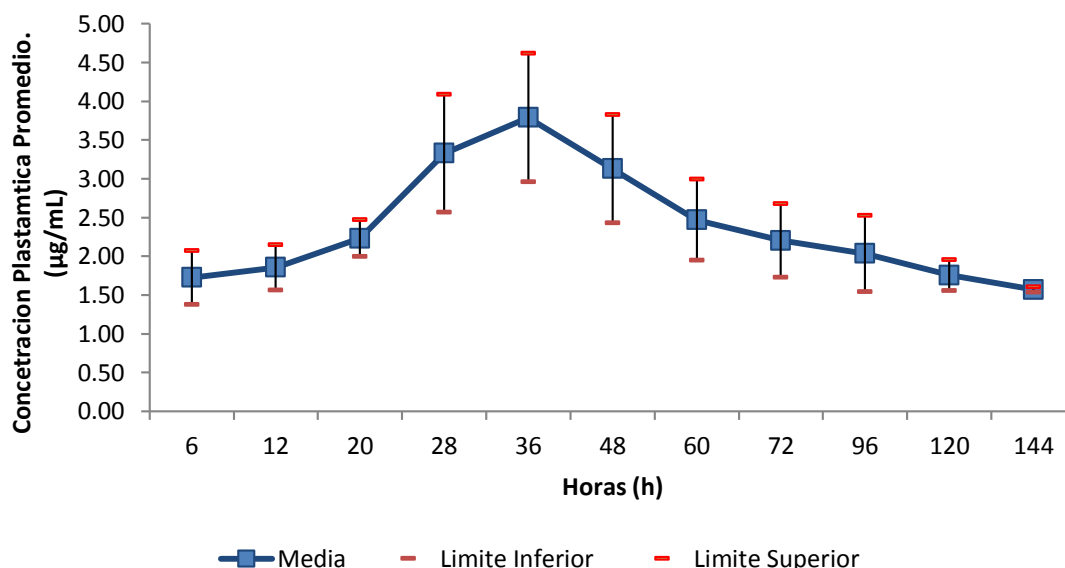


Figura 21. Perfil farmacocinético promedio de ivermectina en escala normal.

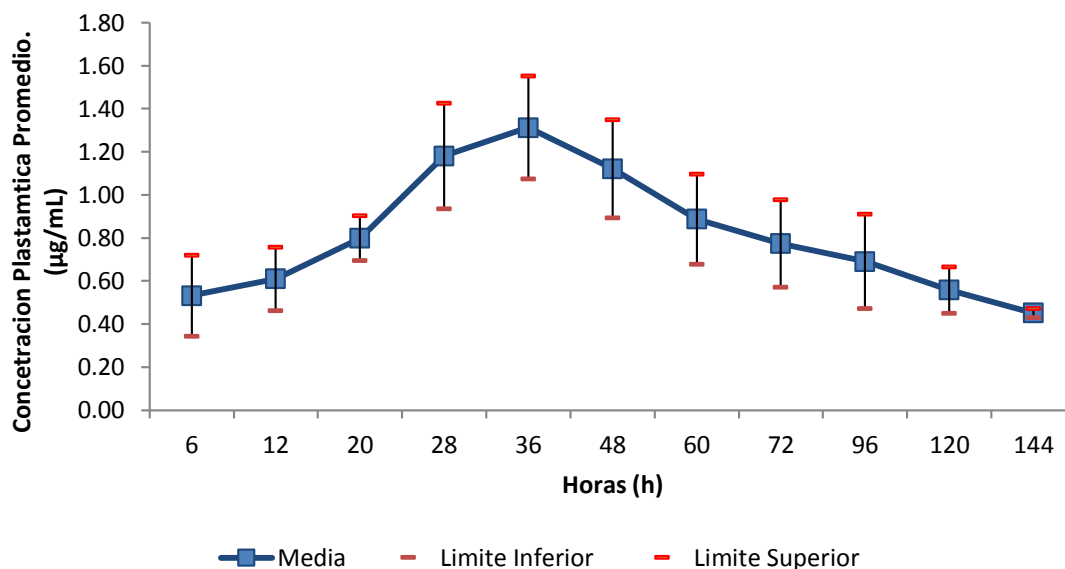


Figura 22. Perfil farmacocinético promedio de ivermectina en escala semilogarítmica.

En el diseño de nuevas formas farmacéuticas es necesario realizar una correlación *in vitro-in vivo*, estudios previos sobre los preparación y caracterización de polímeros cargadas con ivermectina para uso tópico mostró una cinética de liberación del fármaco de tipo Higuchi (Tavares et al. 2017) este mecanismo de liberación refleja una cinética *in vivo* cercana al orden cero lo cual quiere decir que su absorción no depende de la concentración. A su vez un modelo Higuchi describe la liberación del fármaco mediante un proceso de difusión, donde la velocidad de difusión se verá afectada por factores como la solubilidad del fármaco, la temperatura, la relación fármaco/excipiente, el tamaño del poro, la masa y la viscosidad del medio (Gómez, L., 2009).

6.7.3. Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos.

Los parámetros farmacocinéticos fueron determinados a través de métodos no compartimentales (modelo independiente). La estadística descriptiva se presenta a continuación (Tabla 17). Los datos individuales se incluyen en el anexo 9.3. En comparación con el estudio realizado Gökhan Eraslan y colaboradores (2010), a través de la inyección subcutánea de varios productos de ivermectina con la misma concentración y dosis, se distingue una gran diferencia en las constantes de absorción (K_{ab}) y eliminación (K_{el}) calculadas por el método de mínimos cuadrados, se encontró que ésta es mucho menor por vía transdérmica y sostenida en comparación con la administración de inyección subcutánea. En la Tabla 17 se han encontrado diferencias significativas (Cengiz Gokbulut

et al. 2006) como los valores menores o mayores de tiempo de vida media ($t_{1/2}$), $C_{m\acute{a}x}$, K_{ab} - K_{el} $T_{m\acute{a}x}$, y ABC, donde el emulgel muestra una absorción lenta, pero con mayor eficacia en comparación con una vía de administración convencional.

Tabla 17 Estadística descriptiva de los parámetros farmacocinéticos, para los sujetos experimentales del estudio piloto de ivermectina

	Promedio	D.E.	%C.V.	E. E	Mediana	Mínimo	Máximo
M	1.92	0.41	21.1%	0.09	1.87	1.44	2.49
Ka(1/h)	-0.06	0.01	16.3%	0.07	-0.06	-0.07	-0.04
Kel (1/h)	-0.02	0.01	39.5%	0.16	-0.02	-0.03	-0.01
ta 1/2 (h)	12.32	2.13	17.3%	0.07	11.91	10.28	15.68
tel 1/2 (h)	46.87	18.20	38.8%	0.16	44.19	26.26	68.63
ABC 0-t (h*µg/ mL) método trapeacios	306.2	23.8	7.8%	0.03	314.4	261.0	327.3
ABC 0-inf (h*µg/ mL) método trapeacios	379.2	30.4	8.0%	0.03	376.0	342.5	423.8
ABCM 0-inf (h²*µg/ mL)	32562.8	7630.3	23.4%	0.10	30037.3	25725.7	44410.8
ABCM 0-t (h²*µg/ mL)	16307.9	2609.8	16.0%	0.07	15919.7	13368.4	21189.5
TMR 0-t (h)	57.3	10.0	17.4%	0.07	52.0	49.1	73.1
TMR 0-inf (h)	0.15	0.03	19.2%	0.08	0.14	0.13	0.21
Cmax (µg/mL)	3.35	1.33	39.8%	0.16	3.77	1.30	4.53

Entre estudios farmacocinéticos similares realizados en perros por Gokbulut y colaboradores (2006), con dosis de 200 µg/kg de peso por vía subcutánea, la distribución de plasma de ivermectina se determinó en el período entre la primera hora y el día 40

después de la administración. Los valores C_{max} , t_{max} y AUC_{0-inf} se determinaron como 66.80 ng/ml, 1.40 día y 349.18 ng*day/ml, respectivamente.

En este caso se puede ver que hay diferencias significativas de las $C_{máx}$ y que los valores del ABC_{0-inf} son diferentes entre ambas vías de administración. Esto se explica por las propiedades del emulgel y las propiedades fisiológicas del lugar donde se absorbe el fármaco. Con respecto a la administración transdérmica, la ivermectina se deposita entre la dermis y el tejido adiposo, lo que facilita la absorción del fármaco el cual se libera de la matriz por difusión. La absorción propiamente dicha y la distribución de la ivermectina por la vía transdérmica se favorecida en excelencia por las propiedades del emulgel para que llegue primero a la circulación sistémica y posiblemente se deposite en los tejidos.

En estudios futuros, se podría considerar un nuevo esquema de muestreo que permita obtener un mayor número de muestras durante periodos más cortos de tiempo con el fin de permitir la caracterización total de las fases de absorción y eliminación de la ivermectina, y así obtener una mayor exactitud estos parámetros farmacocinéticos.

Los resultados se resumen en la Tabla 18 siguiente:

Tabla 18. Resultado de número de huevecillos de *Ancliyostoma caninum* por gramo de heces (h/g) para perros tratados el día 4 con ivermectina en emulgel al 0.5%.

Sujeto	Día								Necropsia
	1	3	4	5	6	7	8	9	
Experimental									
A	1700 h/g	1500 h/g	1200 h/g	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
B	800 h/g	650 h/g	250 h/g	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
C	3050 h/g	3150 h/g	450 h/g	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Los resultados muestran que no se detectaron huevos desde el día 5, esto es, después de la aplicación del emulgel de Ivermectina. La necropsia indicó que los animales estaban totalmente libres de parásitos con las dos aplicaciones. Los resultados muestran claramente la eficiencia de la composición farmacéutica de ivermectina en emulgel de la presente invención y su capacidad para dar niveles plasmáticos terapéuticamente efectivos.

VII. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método analítico para cuantificar ivermectina en plasma de perro empleando una técnica por precipitación de proteínas, la cual es sencilla y rápida. El método analítico desarrollado fue validado y cumplió con los parámetros y criterios de aceptación establecidos en la norma oficial NOM-177-SSA1-2013 demostrando ser:
 - a. Lineal, preciso y exacto en un rango de concentraciones de 25 - 200 µg/mL.
 - b. Selectivo, al no presentarse interferencias al tiempo de retención de ivermectina
 - c. Estable a temperatura ambiente (23-25 °C) en muestra plasmática durante 48 horas, en refrigeración (1-3 °C) en muestra plasmática durante 24 horas y a dos ciclos de congelación-descongelación. La muestra almacenada en el automuestreador (20 °C) fue estable por un periodo menor a 24 horas.
 - d. Exacto y repetible cuando se utilizan muestras plasmáticas lipémicas y hemolizadas.
 - e. Promedio de recobro absoluto mayor o igual del 100%
2. El sistema terapéutico transdérmico de emulgel de ivermectina cumplió con las pruebas de calidad y estabilidad estipuladas para poder ser aplicado en los sujetos experimentales sin provocar alguna lesión o daño en el tejido o el pelo del animal, por lo tanto, se considera una ventaja ante productos existentes en el mercado para su uso.
3. De manera práctica, el sistema terapéutico transdérmico de emulgel de ivermectina permite mejorar la calidad de vida con un efecto terapéutico eficaz y eficiente, asegurando niveles plasmáticos constantes. El método nos permitió una adecuada caracterización de los parámetros farmacocinéticos principales, obteniéndose los siguientes valores: $T_{\text{máx}} = 36$ (h), $C_{\text{máx}} = 3.35 \pm 1.33$ (µg/mL), $ABC_{0-t} = 306.2 \pm 23.8$ (h*µg/mL), $ABC_{0-\infty} = 379.2 \pm 30.4$ (h*µg/mL), $k_{ab} = 0.06 \pm 0.01$ (1/h), $k_{el} = 0.02 \pm 0.01$ (1/h), y $t_{1/2} = 46.87 \pm 18.20$ (h).
4. El conteo de huevesillos evaluó la efectividad de la administración Pour-on de Ivermectina en el tratamiento de parasitosis, se considera que dos aplicaciones del sistema terapéutico transdérmico de emulgel de ivermectina al 0.05% aseguran una completa eliminación. La disminución en la frecuencia de las dosificaciones, junto a una mayor comodidad y facilidad que conlleva un mejor cumplimiento del tratamiento.

VIII. REFERENCIAS.

1. Abd El-Bary A, Shalaby S, Abd El-Aal S. (2001). Formulation and stability of chloramphenicol gel and emulgel. *Bulletin of Faculty of Pharmacy*: 39, 89-99.
2. Acha P, Szyfres B. (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. México: Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud; 246-251, 727-728.
3. Aguilar, A., Caamaño, M., Martín, F. y Montejo, M. (2008) *Biofarmacia y Farmacocinética*. España; Elsevier.
4. Andreas M. Abend, Le Chung, David G. McCollum, W. Peter Wuelfing (2003). Development and validation of an automated extraction method (accelerated solvent extraction) and a reverse-phase HPLC analysis method for assay of ivermectin in a meat-based chewable formulation *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.: 31, 1177-1183.
5. Anene, B. M., Nnaji, T.O., Chime, A.B. (1996). Intestinal parasitic infections of dogs in the Nsukka area of Enugu state, Nigeria. *Preventive Veterinary Medicine*; 27(1-2): 89-94.
6. Anu Hardenia, Sonali Jayronia y Sanjay Jain. (2014) Emulgel: an emergent tool in topical drug delivery. *IJPSR4*: 5(5), 1653-1660.
7. Baggot, J.D. (2001) *The Physiological Basis of Veterinary Clinical Pharmacology*. Blackwell Science, Oxford.
8. Baggot, J.D., McKellar, Q. A. (1994). The absorption, distribution and elimination of anthelmintic drugs: the role of pharmacokinetics. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*: 17 (6), 409-419.
9. Barr, M. (1962). Percutaneous absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 51, 5, 395-409.
10. Bennet, S.; Barry, B. y Woodford, R. (1985), Optimization of bioavailability of topical steroids: non-occluded penetration enhancers under thermodynamic control. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*., 37, 298-304.
11. Bernad, M., Ganem, A., Melgoza, Luz M., Quintanar, D. Sistemas de liberación controlada de activos farmacéuticos, *Tópicos selectos de Tecnología Farmacéutica*. Asociación Farmacéutica Mexicana: 94-101.
12. Blood, D. C., Henderson, J. A., Radostitis, O. M. (1988) *Medicina Veterinaria*. México: Interamericana; 1411.

13. Brown, P., (1984). HPLC in Nucleic Acid Research: Methods and Applications. USA: Marcel Dekker.
14. Bruton, L. (1996). En: Las bases fármacológicas de la terapéutica. A. Goodman Gilman, L. Goodman, T. Rall y F. Murad (eds). Mc Graw Hill: Sección IV, Capítulo 26, 965-971.
15. Campbell, W.C. (1993). Ivermectin an antiparasitic agent. Medicinal Research Reviews:13(1), 61-79.
16. Carpentieri, L., Modolo, J. y Hinke, I. (2007). Percutaneous absorption enhancers: mechanisms and potential. Brazilian Archives of Biology and Technology. 50 (6).
17. Cengiz Gokbulut, Umit Karademir, Murat Boyacioglu, Quintin A. McKellar (2006). Comparative plasma dispositions of ivermectin and doramectin following subcutaneous and oral administration in dogs. Veterinary Parasitology: 135, 347-354
18. Cerkvenik, V., Grabnar. I. (2002). Ivermectin pharmacokinetics. Slovenian Veterinary Research: 39(3/4), 167-178.
19. Chandrashekar, N. S., y Shobha Rani, R. H. (2008) Physicochemical and Pharmacokinetic Parameters in Drug Selection and Loading for Transdermal Drug Delivery Indian Journal of Pharmaceutical Sciences. 70(1): 94–96
20. Cooper, E. (1984), Increased skin permeability for lipophilic molecules. J Journal of Pharmaceutical Sciences, 73, 8, 1153-1156.
21. Cunningham, F., Elliott, E., Lees, P. (2004) Comparative and Veterinary Pharmacology. Gran Bretaña: Springer; 32-35, 88-89.
22. Dellman, D. (1993). (2ª ed.). Histología Veterinaria. Zaragoza; Acribia.
23. Eccleston, G.M. Emulsions. In: Swarbrick J, Boylan JC., (1992). Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. New York, NY: Marcel Dekker 137-188.
24. Faulkner, A., Wang, Q., DeMontigny, P. y Murphy, J. (1997). Stability studies and high-performance liquid chromatographic procedures for L-648,548 and its major degradates in an animal health formulation. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.: 15, 523-536.
25. Fink, D. y Porras, A. (1989) Pharmacokinetics of Ivermectin in Animals and Humans. Campbell W.C. Ivermectin and Abamectin. USA: Springer, 113-130
26. Finnin, B. y Morgan, T. (1999), Transdermal Penetration enhancers: Applications, Limitations, and Potential. Journal of Pharmaceutical Sciences, .88, 10, 955-957
27. Fisher, M., y Macgarry, J. (2007). Libro en fundamentos de parásitología en animales de compañía. Buenos Aires: Intermedica.

28. Fujii, M.; Hori, N.; Shiozawa, K.; Wakabayashi, K.; Kawahara, E. y Matsumoto, M. (2000), Effect of fatty acid esters on permeation of ketoprofen through hairless rat skin. *International Journal of Pharmaceutics.*, 205, 117-125.
29. Gibaldi, M. y Perrier, D. (2006). *Farmacocinética*. México; Reverté
30. Gokbulut, C, Nolan, A. M. y McKellar Q. A. (2001). Plasma pharmacokinetics and faecal excretion of ivermectin, doramectin and moxidectin following oral administration in horses. *Equine Veterinary Journal*:33(5), 494-498.
31. Gökhan Eraslan, Murat Kanbur, Bilal Cem Liman, Yücel Çam, Mürsel Karabacak, Sule Altinordulu. (2010) Comparative pharmacokinetics of some injectable preparations containing ivermectin in dogs. *Food and Chemical Toxicology*: 48, 2181–2185
32. Gómez, M. (2009). Elaboración y caracterización de sistemas semisólidos bioadhesivos de liberación controlada para el tratamiento de ectoparásitos (*B. Microplus*) en bovinos (Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
33. González Canga, A., Sahagún Prieto, A., Diez Liébana, M., Fernández Martínez, N., Sierra Vega, M. y García Vieitez, J. (2008) The Pharmacokinetics and Interactions of Ivermectin in Humans. *American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*: 10 (1); 42-46
34. González-Ramosa, J., González-Silvab, Hernández-Canoa, N., Vidaurrázaga-Arcayaa, C., Herranz-Pintoa, P. (2015) Infestación cutánea diseminada por *larva migrans*. *Semergen*: 41 (8)
35. Goodman y Gilman. (1996). Capítulo 1 Farmacocinética. Las bases fármacológicas de la terapéutica. México. Mc Graw Hill Interamericana., 5 – 24.
36. Gutiérrez, J. (2006). *Parásitología clínica: parásitosis digestivas del perro y del gato*. España: MultiMedica Ediciones Veterinarias.
37. Hamza, Y.E., Molokhia, A.M., Soliman, I.I., Ahmed, F.H., Soliman, N.A. (2002) Formulation and evaluation of topical preparations containing phenol and local vesicants. *Journal of Pharmaceutical*: 29,412-432.
38. Hanai, T. (1999). *HPLC: A Practical Guide*. Reino Unido: The Royal Society of Chemistry.
39. Heymann, D. (2005) El control de las enfermedades transmisibles. Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud; 241-249.
40. Ho, H.; Huang, F.; Soroloski, T.D. y Sheu, M. (1994), The influence of cosolvents on the in vitro percutaneous penetration of diclofenac sodium from a gel system. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.*, 46, 636-642.

41. International Conference on Harmonisation (ICH), Validation of Analytical Procedures Text and Methodology Q2(R1).
42. Jenkins D., Andrew P. L. (1993). Intestinal parasites in dogs from an aboriginal community in New South, Wales. *Australian Veterinary Journal*; 70(3), 115-116.
43. Klich, C.M. Jels and Jellies. In: Swarbrick J, Boylan JC, eds. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. Vol 6. (1992) New York, NY: Marcel Dekker Inc, 415-439.
44. Kojima, K., Yamamoto, K., Katae, H., Nakanishi, Y. (1987) Bioavailability of oral ivermectin in dog. *Nippon Juigaku Zasshi* 49(5), 899–900
45. Lanusse C, Lifschitz A, Virkel G, Alvarez L, Sánchez S, Sutra JF, Galtier P, Alvinerie M. (1997). Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*: 20(2), 91-99.
46. Lanusse, C. (1994). Factores que afectan la biodisponibilidad plasmática y eficacia de fármacos antihelmínticos. *Archivos de medicina veterinaria*:26(1), 5-14.
47. Lespine, A., Dupuy, J., Alvinerie, M., Comera, C., Nagy, T., Krajcsi, P., y Orłowski, S. (2009) Interaction of Macrocyclic Lactones with the Multidrug Transporters: The Bases of the Pharmacokinetics of Lipid-Like Drugs. *Current Drug Metabolism*: 10 (3).
48. Lo, P.K., Fink, D.W., Williams, J.B., Blodinger, J. (1985) Pharmacokinetic studies of ivermectin: effects of formulation. *Veterinary Research Communications*: 9 (4),251–268
49. Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M. y Portoles, A. (2004) Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica*. Editorial Medica Panamericana; México.
50. Martínez, L., González-Carbajal, M. (2003). Diagnóstico y tratamiento de la estrongiloidosis. Recuperado de: http://www.bvs.sld.cu/revistas/mil/vol40_02_11/mil07211.html Revisado el Junio del 2016.
51. Martinez, N.M.; Langston, C.; Martin, T. y Conner, D. (2002) Challenges Associated with the Evaluation of Veterinary Product Bioequivalence: an AAVPT Perspective. *Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 25, 201-220.
52. McKellar Q.A., Jackson F., Coop R.L., Jackson E., Scott E. (1991). Effect of parasitism with *Nematodirus battus* on the pharmacokinetics of levamisole, ivermectin and netobimin. *Veterinary Parasitology*: 39(1-2), 123-136.
53. McMaster, M., (2007). *HPLC: A Practical User's Guide*. USA:John Wiley & Sons.
54. McPolin, O. (2009). *An Introduction to HPLC for Pharmaceutical Analysis*. Reino Unido: Mourn Training Services.

55. Meeus, P.F.M., De Bont, J. y Vercruyssen, J. (1997). Comparison of the persistent activity of ivermectin, abamectin, doramectin and moxidectin in cattle in Zambia. *Vet. Parasitol.* 70(4):219-224.
56. Meyer, V. R. (2004) (4ta. Ed.) *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. USA: John Wiley & Sons.
57. Mohammed Haneefa, K.P., Easo, S., Hafsa, P.V., Prasad Mohanta, G., Nayar, C. (2013) Emulgel: An Advanced Review. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 5 (12), 254 – 258
58. Mohd. Al, Sanjar Alam, S. Ahmad, A. K. Dinda y F. J. Ahmad (2010) Determination of ivermectin stability by high-performance thin-layer chromatography. *International Journal of Drug Development & Research*: 3 (2).
59. Muñoz, M. (2003). *Dirofilaria immitis* Enfermedad del gusano del corazón. Recuperado de: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/fvm971d/doc/fvm971d.pdf> Revisado el Junio del 2016.
60. Nelson, R. y Couto, G., (2010). *Manual de medicina interna de pequeños animales*, Madrid: Elsevier España, S.A.
61. Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados para que realicen las prueba.
62. Omura, S. (2007). Ivermectin: 25 years and still going strong. *International Journal of Antimicrobial Agents* 31:91-98.
63. Panchagnula, R., y Narisetty, S.T. (2000). Biopharmaceutics and pharmacokinetics in drug research. *Journal of Pharmaceutics*.
64. Parriott, D., (1993). *A Practical Guide to HPLC Detection*. USA: Academic Press.
65. Pazo, S., (2001) *Farmacocinética de los medicamentos*. España; Diaz de Santos.
66. Pérez R., Cabezas I., Sutra J.F., Galtier P., Alvinerie, M. (2001). Faecal excretion profile of moxidectin and ivermectin after oral administration in horses. *The Veterinary Journal*: 161(1):85-92.
67. Perhing, L.; Lambert L. y Knutson, K. (1990). Mechanism of ethanol-enhanced estradiol permeation across human skin in vivo. *Pharmaceutical Research*., 7, 170-175.
68. Pitterna, T., Cassayre, J., Hüter, O. F., Jung, P. M., Maienfisch, P., Kessabi, F. M., Quaranta, L. y Tobler H. (2009). New ventures in the chemistry of avermectinas. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*: 17(12):4085-4089

69. Prieto, J.G., Merino, G., Pulido, M.M., Estevez, E., Molina, A.J., Vila, L., Alvarez, A.I. (2003) Improved LC method to determine ivermectin in plasma *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.: 31, 639-645.
70. Quiñonez, A.F., Espine, A.L., Rodríguez-Vivas, R.I., Domínguez-Alpizar, J.L. (1998) Contribución al estudio de los helmintos del tracto digestivo de perros de la ciudad de Mérida, Yucatán, México. *Revista de la AMMVEPE*; 9(6): 191-193
71. Quiroz, R. H. (1989). *Parásitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*. México: Limusa; 826.
72. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., y Moore, P.K. (2004). *Farmacología*. Madrid: Churchill Livingstone; 96-113.
73. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., y Moore, P.K. (5 ed.). (2003) *Pharmacology* London. UK: Churchill Livingstone.
74. Rani, S. y Pargal, A. (2004) Bioequivalence: An Overview of Statistical Concepts. *Indian Journal of Pharmacology*. 37, 209-216.
75. Rathbone, M.J., Gurny, R., (2000) *Controlled Release Veterinary Drug Delivery: Biological and Pharmaceutical Considerations*. Pharmaceutical Science.
76. Rescigno, A. (2000) Area Under the Curve and Bioavailability. *Pharmaceutical Research*. 42. 539-540.
77. Rescigno, A. y Powers, J.D. (1998) AUC and Cmax are not Sufficient to Prove Bioequivalence *Pharmaceutical Research*. 37, 539-540.
78. Rieger, M.M. Emulsions. In: Lachman, L., Lieberman, H.A, Kanig JL, (3 ed.) (1986) *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*. Philadelphia, PA: Lea and Febiger:502-533.
79. Ritschel, W., Kearns, G. L. (7 ed.). (2009). *Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications*. American Pharmacists Association: Washington, DC, EEUU.
80. Riviere, J. y Papich, M. (2009) (9na. Ed) *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. USA: John Wiley & Sons, 1130-1140.
81. Robards, K. y Haddad, P.R. (2004) *Principles and practice of modern chromatography method*. USA: Elsevier. 228-260; 433-452.
82. Roder, R.S. (2001). *The practical veterinarian: Veterinary toxicology*. Butterworth-Heinemann, USA.
83. Romero, R. (2007). *Microbiología y Parásitología Humana; bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. México: Editorial Panamericana.

84. Rouessac F. y Rouessac, A. (2003). Análisis Químico métodos y técnicas instrumentales modernos. España. Mc Graw-Hill.
85. Sallovitz J., Lifschitz A., Imperiale F., Pis A., Virkel G. y Lanusse, C. (2002). Breed differences on the plasma availability of moxidectin administered pour-on to calves. *The Veterinary Journal*: 164(1), 47-53.
86. Scott, D; Miller, W.; Griffin, C. (6a ed.) (2001) *Small Animal Dermatology*. W.B Saunders Co, Philadelphia.
87. Scott, E.W., McKellar. Q. A. (1992). The distribution and some pharmacokinetic parameters of ivermectin in pigs. *Veterinary Research Communications*: 16(2),139-146.
88. Shoop, W.L., H. Mrozik and M.H. Fisher. (1995). Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Veterinary Parasitology*: 59(2), 139-156.
89. Shuet-Hing Lee Chiu, Elena Sestokas y Rae Taub. (1988) Application of two-dimensional high-performance liquid chromatography in metabolism studies of ivermectin. *Journal of Chromatography*: 433, 217-224
90. Sigma Aldrich. Bulletin 826E. HPLC Troubleshooting Guide Recuperado de: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/hplc-troubleshooting-guide.html> Revisado el Junio del 2017.
91. Skoog, A., West, M., James, F., y Crouch, R. (2005). Fundamentos de química analítica. México: Thomson; 662 – 670.
92. Skoog, D. A. y West, D. M. (2001) (7 ed.) *Química Analítica*; México; Editorial McGraw-Hill: 636-714.
93. Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Glajch, J. L., (2011) (2da Ed.) *Practical HPLC Method Development*. USA:John Wiley & Sons.
94. Somsorn Chittrakarn, Benjamas Janchawee, Pritsana Ruangrut, Supaporn Kansenalak, Usa Chethanond, Theerayot Kobasa, Suwich Thammapalo. (2009) Pharmacokinetics of ivermectin in cats receiving a single subcutaneous dose. *Research in Veterinary Science*: 86, 503–507
95. Soulsby, E.J.L. (1987). *Parásitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. México: Interamericana; 16-40.
96. Steel, J.W. (1993). Pharmacokinetics and metabolism of avermectins in livestock. *Veterinary Parasitology*: 48(1-4), 45-57.
97. Tavares, E., De Araújo, D., Fraceto, L. (2017) Ivermectin-Loaded Polymeric Nanoparticles: Screening the Effects of Polymers, Methods, and the Usefulness of Mathematical Models. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*: 17 (6); 4218-4234.

98. Teijón Rivera, J. M., Barrido Pertierra, A., (2001) Bioquímica estructural. Conceptos y tests. Tebar.
99. Thrusfield, M. (3ra. Ed.) (1995). Veterinary Epidemiology. Oxford: Blackwell Science; 129.
100. Toutain P.L., Upson D.W., Terhune T.N., McKenzie M.E. (1997). Comparative pharmacokinetics of doramectin and ivermectin in cattle. Veterinary Parasitology: 72(1), 3-8.
101. Toutain, P. y Bousquet-Mélou, A. (2004) Bioavailability and its Assessment. Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 27, 455-466.
102. Toutain, P. y Koritz, G.D. (1997) Veterinary Drug Bioequivalence Determination. Journal Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 20, 79-90.
103. Wilfried M.A. Niessen. (2006) (3er. Ed.) Liquid Chromatography- Mass Spectrometry; Chromatography Science Series. USA: Taylor & Francis Group; pág 3-21.
104. Willard, H., Merritt, L., Dean, J., y Settle F. (2002). Métodos instrumentales de análisis. México: Grupo Editorial Iberoamérica.
105. Winter, M. (1994) Farmacocinética clínica básica. España; Diaz de Santos.
106. Zhang, X.L., Zhao, R., Qian, W. (1995). Preparation of an emulgel for treatment of aphthous ulcer on the basis of carbomers. Chinese Pharmaceutical Journal: 30, 417-418.

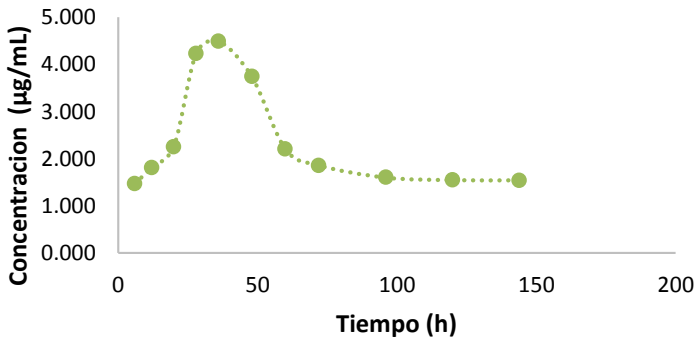
IX. ANEXOS

9.1. Concentraciones plasmáticas para Ivermectina de cada sujeto experimental a los diferentes tiempos de muestreo.

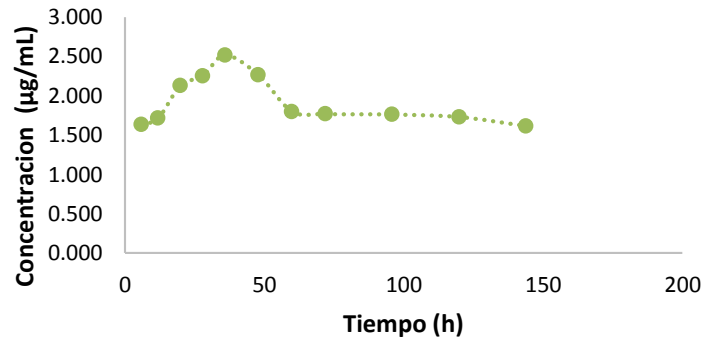
Tiempo (h)		6	12	20	28	36	48	60	72	96	120	144
Sujeto Experimental y Concentración Plasmática (µg/mL)	1	1.48	1.81	2.26	4.23	4.49	3.74	2.21	1.86	1.60	1.55	1.55
	2	1.64	1.71	2.13	2.25	2.52	2.26	1.80	1.77	1.76	1.73	1.62
	3	2.31	2.37	2.54	3.59	4.53	3.19	2.56	1.97	1.85	1.73	1.60
	4	1.55	1.64	2.04	3.66	4.25	4.01	3.30	3.00	2.92	2.12	1.56
	5	1.46	1.66	1.98	2.68	3.30	2.96	2.56	2.31	1.94	1.73	1.54
	6	1.92	1.94	2.45	3.56	3.67	2.60	2.38	2.31	2.14	1.68	1.55
Promedio		1.73	1.86	2.23	3.33	3.79	3.13	2.47	2.20	2.03	1.76	1.57
D. E.		0.33	0.28	0.23	0.72	0.79	0.67	0.50	0.45	0.47	0.19	0.03
C. V.		19.16	14.96	10.09	21.73	20.84	21.28	20.06	20.49	22.98	10.86	2.00
Límite Inferior		1.38	1.56	2.00	2.57	2.96	2.43	1.95	1.73	1.54	1.56	1.54
Límite Superior		2.07	2.15	2.47	4.09	4.62	3.83	2.99	2.68	2.53	1.96	1.60
Mediana		1.60	1.76	2.19	3.57	3.96	3.07	2.47	2.14	1.90	1.73	1.56
Mínimo		1.46	1.64	1.98	2.25	2.52	2.26	1.80	1.77	1.60	1.55	1.54
Máximo		2.31	2.37	2.54	4.23	4.53	4.01	3.30	3.00	2.92	2.12	1.62

9.2. Gráficas de concentración plasmática en escala semilogarítmica y normal con respecto al tiempo para cada animal o sujeto experimental.

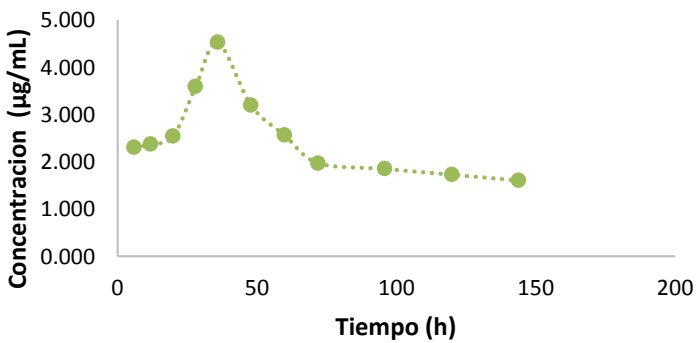
Sujeto Experimental 1



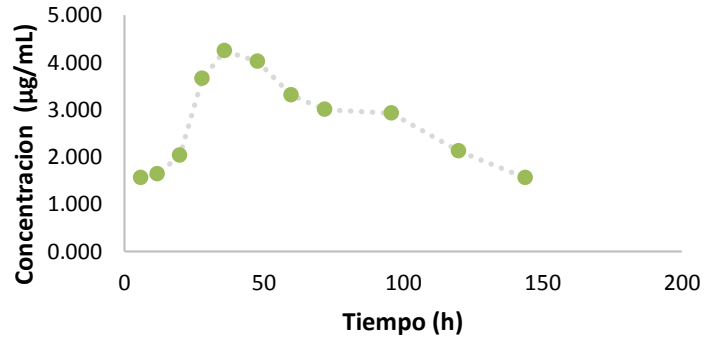
Sujeto Experimental 2



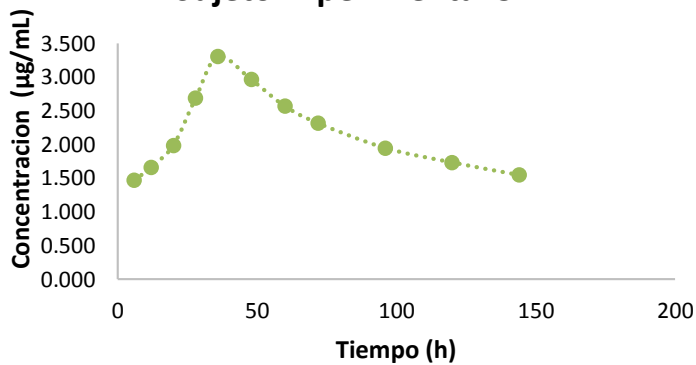
Sujeto Experimental 3



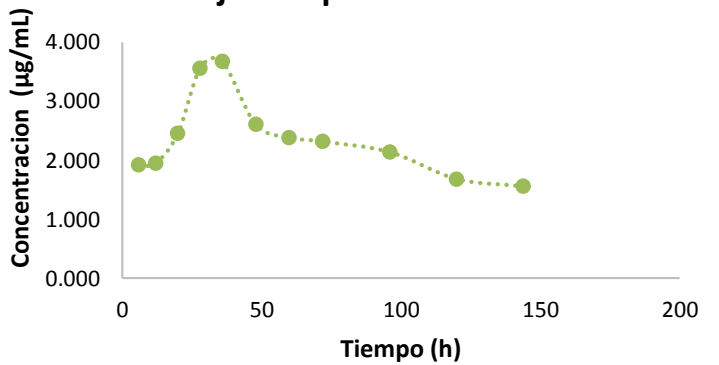
Sujeto Experimental 4



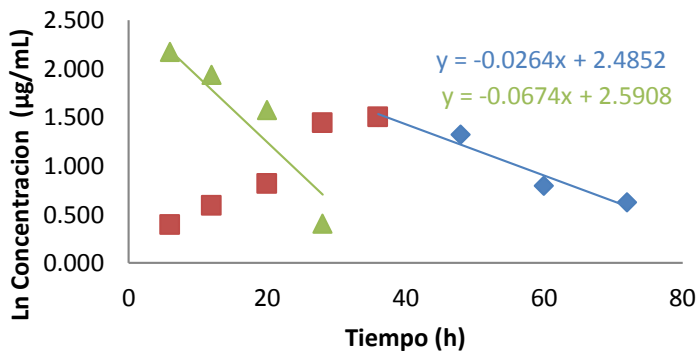
Sujeto Experimental 5



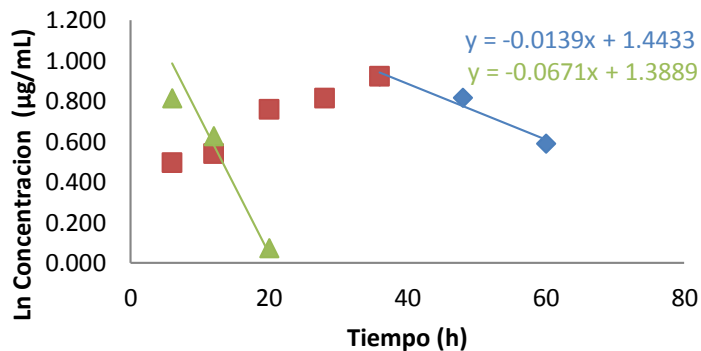
Sujeto Experimental 6



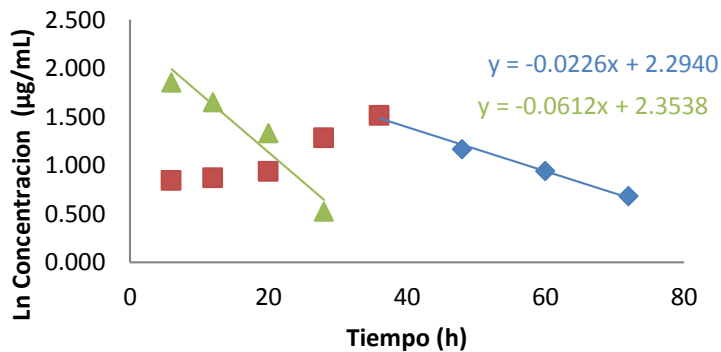
Sujeto Experimental 1



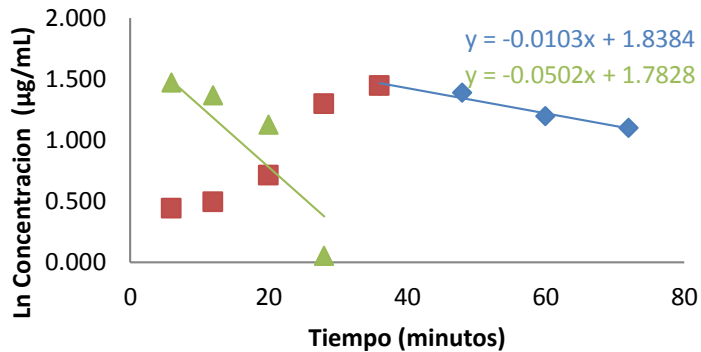
Sujeto Experimental 2



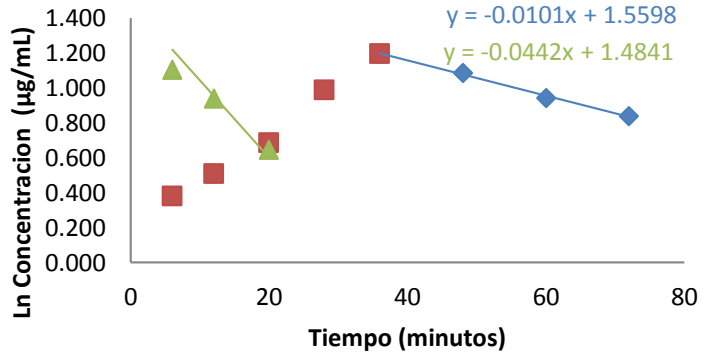
Sujeto Experimental 3



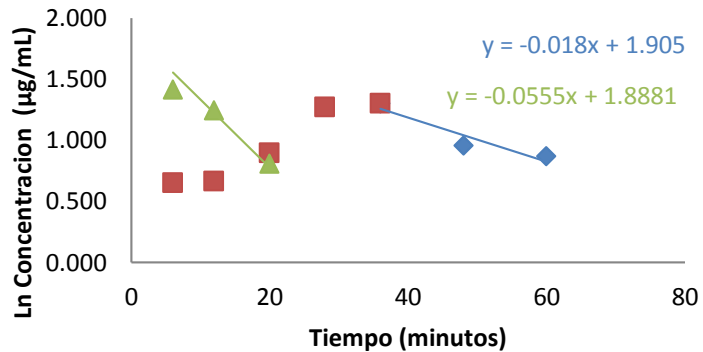
Sujeto Experimental 4



Sujeto Experimental 5



Sujeto Experimental 6



9.3. Parámetros farmacocinéticos.

SE	1	2	3	4	5	6	Promedio	DE	C. V.	Mediana	Mínimo	Máximo	E. E
M	2.49	1.44	2.29	1.84	1.56	1.91	1.92	0.41	0.21	1.87	1.44	2.49	0.09
Ka(1/h)	-0.07	-0.07	-0.06	-0.05	-0.04	-0.06	-0.06	0.01	0.16	-0.06	-0.07	-0.04	0.07
kel (1/h)	-0.03	-0.01	-0.02	-0.01	-0.01	-0.02	-0.02	0.01	0.40	-0.02	-0.03	-0.01	0.16
ta 1/2 (h)	10.28	10.33	11.33	13.81	15.68	12.49	12.32	2.13	0.17	11.91	10.28	15.68	0.07
tel 1/2 (h)	26.26	49.87	30.67	67.30	68.63	38.51	46.87	18.20	0.39	44.19	26.26	68.63	0.16
ABC0-t (µg/h*mL) método trapecios	313.14	260.96	327.32	319.29	300.79	315.71	306.20	23.80	0.08	314.42	260.96	327.32	0.03
ABC0-inf (µg/h*mL) método trapecios	353.39	342.45	376.84	423.81	403.57	375.12	379.19	30.41	0.08	375.98	342.45	423.81	0.03
ABCM0-inf (µg/h*mL)	25848.64	30551.38	25725.66	44410.76	39317.18	29523.17	32562.80	7630.30	0.23	30037.27	25725.66	44410.76	0.10
ABCM0-t (µg/h*mL)	15193.15	13368.36	16058.25	21189.48	15781.07	16256.95	16307.88	2609.82	0.16	15919.66	13368.36	21189.48	0.07
TMR 0-t	73.15	51.23	49.06	66.37	52.47	51.49	57.29	9.95	0.17	51.98	49.06	73.15	0.07
TMR 0-inf	0.21	0.15	0.13	0.16	0.13	0.14	0.15	0.03	0.19	0.14	0.13	0.21	0.08
Cmax	4.49	2.25	4.53	4.25	3.30	1.30	3.35	1.33	0.40	3.77	1.30	4.53	0.16