



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“FORMULACIÓN INTELIGENTE DE IVERMECTINA PARA EL CONTROL DE LA
GARRAPATA EVITANDO EFECTOS ADVERSOS EN EL EQUILIBRIO ECOLÓGICO”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B LORENA GARCÍA GONZÁLEZ



TUTOR: Dra. Ma. Josefa Bernad Bernad

AÑO:2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	Dr. Rafael Herrera Nájera
VOCAL:	Dr. Carlos Guillermo Gutiérrez Aguilar
SECRETARIO:	Dr. David Quintanar Guerrero
PRIMER SUPLENTE:	Dra. Luz María Melgoza Contreras
SEGUNDO SUPLENTE:	Dra. Helgi Jung Cook

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 002 del Departamento de Farmacia, Edificio F, Facultad de Química, UNAM.
Ciudad Universitaria.

*Vivir no es sólo existir, sino existir y crear, saber gozar y sufrir y no dormir sin soñar. Descansar,
es empezar a morir.*

Gregorio Marañón (1887-1960)

AGRADECIMIENTOS

*Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo para la realización
de esta tesis que fue posible gracias al financiamiento de los estudios de Maestría en
Ciencias Químicas otorgándome la beca 206028.*

*Este trabajo forma parte del Macroproyecto Productividad sostenible de los hatos de cría
en pastoreo y se finalizó con la ayuda de una beca.*

*Por el apoyo brindado para la realización y termino de la tesis a la Dra. Josefa Bernad,
Dra. Yazmín Alcántara, Dr. Jesús Gracia Mora, Dr. Federico del Río Portillo y el Dr.
Rafael Herrera.*

ÍNDICE

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	3
III. ANTECEDENTES.....	5
3.1 Parásitos.....	5
3.1.1. Garrapata <i>Boophilus microplus</i>	5
3.1.2. Ciclo biológico de la garrapata.....	6
3.2 Control de las garrapatas.....	7
3.2.1 Control químico.....	7
3.2.1.1 Compuestos clorinados.....	7
3.2.1.2 Organosfosforados.....	8
3.2.1.3 Carbamatos.....	8
3.2.1.4 Piretroides.....	8
3.2.1.5 Formamidinas.....	8
3.2.1.6 Benzolifenilúreas.....	8
3.2.1.7 Closantel.....	9
3.2.1.8 Ivermectina.....	9
3.2.1.8.1 Ficha técnica.....	10
3.2.1.8.2 La absorción, distribución, metabolismo y excreción.....	10
3.2.1.8.3 Límites máximos de residuos y toxicidad.....	11
3.2.1.8.4 Estudios realizados sobre liberación de ivermectina.....	12
3.2.2 Control biológico.....	12
3.2.3 Control genético.....	14
3.2.4 Control físico o natural.....	14
3.2.5 Resistencia.....	15
3.2.5.1 Caracterización y distribución de la resistencia de garrapatas <i>B. microplus</i> en México.....	16
3.3 Sistemas de liberación controlada.....	17
3.4 SLC poliméricos.....	18
3.4.1 Métodos de obtención de NCs.....	19
3.4.1.1 Polimerización interfacial.....	19
3.4.1.2 Desplazamiento de solvente.....	19
3.4.1.3 Emulsión- evaporación.....	20
3.4.1.4 Emulsificación-difusión.....	20
3.4.1.5 Emulsificación- difusión por desplazamiento de solvente.....	20
3.4.2 Caracterización de las nanocápsulas.....	20
3.4.2.1 Tamaño de partícula.....	20
3.4.2.2 Potencial zeta.....	21
3.4.2.3 Morfología.....	21

3.4.2.4 Comportamiento térmico	21
3.4.2.5 Densidad de gradiente	21
3.5 Impacto ambiental de la ivermectina.....	21
3.6 Polímeros molecularmente impresos.....	23
3.6.1 Historia.....	23
3.6.2 Aplicación de los polímeros de impresión.....	25
3.6.3 Mecanismos de preparación de los MIPs.....	26
3.6.4 Ventajas e inconvenientes de los MIPs como elementos de reconocimiento.....	27
3.6.5 Síntesis de MIPs.....	28
3.6.6 Caracterización del polímero de impresión molecular	28
3.6.6.1 Caracterización química.....	28
3.6.6.2 Caracterización morfológica	29
IV. OBJETIVOS.....	31
V. PARTE EXPERIMENTAL	32
5.1 Materiales	32
5.2 Metodología.....	33
5.2.1 Polímero de impresión	33
5.2.1.1. Síntesis	33
5.2.1.2. Cinética de equilibrio del polímero de impresión-ivermectina.....	34
5.2.1.3. Estudio de eficacia del proceso de estampado	35
5.2.1.4. Efecto del polímero de impresión sobre escarabajos	35
5.2.2. Nanocápsulas	35
5.2.2.1. Elaboración de las nanocápsulas.....	36
5.2.2.2 Lavado de las nanocápsulas	37
5.2.2.3. Caracterización de las nanocápsulas	37
5.2.3 Estudio en ratones.....	39
5.2.3.1 Efecto de la interacción polímero de impresión-ivermectina contenido en heces de ratones sobre los escarabajos.....	39
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	40
VII. CONCLUSIONES	60
VIII. BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXO I.....

I. RESUMEN

Uno de los problemas que esta causando una pérdida cuantiosa en la economía ganadera son los efectos que ocasiona la garrapata *Boophilus microplus*. La resistencia a los fármacos lleva a la síntesis de nuevas moléculas, para ello es necesario un tiempo aproximadamente de 10 años, por lo que la tecnología proporciona diferentes dispositivos y sistemas para la mejora de la eficacia del fármaco, proponiendo un principio activo ya existente como es el caso de la ivermectina en un sistema de liberación modificada.

En base a lo anterior, se planteó desarrollar y evaluar un sistema nanométrico portador de ivermectina a base de polímeros biodegradables (nanocápsulas), así como elaborar polímeros de impresión (imprinted polymers) que favorezcan el encapsulamiento del activo antes de la eliminación.

Para la elaboración de las nanocápsulas se utilizó el método de emulsificación-difusión usando como polímero ácido poliláctico (PLA) y variando diferentes parámetros de proceso para lograr un sistema reproducible y de población monodispersa.

Con lo que respecta al polímero de impresión se sintetizó mediante un método basado en radicales libres, usando como componentes ácido metacrílico (MAA), etilenglicol dimetacrilato (EDGMA), 2,2'-azobis-isobutironitrilo (AIBM), ivermectina y dimetilsulfóxido (DMSO).

En la elaboración del polímero de impresión, el método que permite una mayor eliminación de residuos en menor tiempo es por agitación y remoción del solvente, manifestando que éste se encuentra libre del fármaco a través de la caracterización del mismo por FTIR y SEM.

Después de obtener el polímero de impresión, se llevaron a cabo estudios para conocer su cinética de adsorción con la ivermectina, la afinidad del analito y estudios sobre el efecto de la disminución de muerte en escarabajos de la especie *Aphodius constans*.

Posteriormente, se administraron ambos sistemas (las nanopartículas por vía subcutánea y el polímero de impresión por vía oral) en ratones ICR de edad de 8 semanas, recolectando las heces de la formulación de ivermectina, y el excremento de la interacción de polímero de impresión e ivermectina con el propósito de conocer el efecto de encapsulamiento del fármaco por el polímero impreso sobre el porcentaje de sobrevivencia del escarabajo.

Se obtuvo un sistema de tamaño nanométrico, reproducible y con baja estabilidad coloidal, que fue catalogado como nanocápsulas por microscopía electrónica de transmisión y el estudio de gradiente de densidad.

Al realizar el estudio del efecto del polímero de impresión sobre los escarabajos, resultó que el polímero de impresión no es tóxico para el insecto, mientras que la ivermectina

causa muerte rápida de todos ellos. El efecto de la interacción polímero de impresión ivermectina contenidos en heces de ratones manifiesta que los coleópteros presentan un tiempo de sobrevivencia mayor que cuando es expuesto al principio activo.

II. INTRODUCCIÓN

Un problema a nivel mundial que se ha enfrentado por muchos años en el área veterinaria ha sido el control de los parásitos, como es el caso de la garrapata *Boophilus microplus*, ácaro que trae como consecuencia un impacto negativo en la producción ganadera.

Varios métodos han sido utilizados para la eliminación de la infestación por ixodes, como los baños de inmersión que es el método más conocido y de mayor difusión, Pour-on, inyectables, etc., arrojando que la selección del producto a utilizar debe de tener en cuenta el principio activo.

Existe un patrón de desarrollo exponencial entre el descubrimiento de nuevos insecticidas y el desarrollo de especies resistentes a estos nuevos productos, que se caracteriza por ocurrir a través de los años en menor período de tiempo.

La resistencia que presenta la garrapata a una lista considerable de ixodicidas, pone de manifiesto la necesidad de crear nuevos compuestos, vacunas y estrategias, considerando que el costo de un nuevo garrapaticida es de 100-230 millones de dólares y que puede tardar más de 10 años desde su descubrimiento hasta su disposición en el mercado. Como una opción surge el desarrollo de preparados farmacéuticos de moléculas ya existentes en sistemas de liberación controlada, teniendo como objetivos conducir el fármaco a su lugar de acción y/o liberarlo de una manera controlada.

Dentro de los sistemas de liberación modificada de fármacos se encuentran los sistemas coloidales o transportadores particulados que incluyen, entre otros, a las nanopartículas.

Desde el punto de vista farmacéutico, las Nanocápsulas (NCs) son atractivas porque su cavidad central basada en aceite, permite un alto nivel de encapsulación para sustancias lipofílicas, característica que permite pensar en éste como un sistema viable para encapsular a la ivermectina, además de que en la literatura no aparece información sobre formulaciones basadas en nanocápsulas.

La ivermectina es un agente antiparasitario tanto endo como ectoparasiticida en varias especies animales, estudios realizados utilizándolo como principio activo en diferentes formas farmacéuticas han demostrado que la molécula aún tiene eficacia contra este ácaro.

Algunos fármacos de uso veterinario como la ivermectina modifican el funcionamiento normal del ecosistema afectando a ciertos animales degradadores de materia fecal, en lo particular a los coleópteros coprófagos. Sobre estas bases, el valor económico de estos insectos es muy alto, solo para Estados Unidos de América se ha estimado que en ausencia de estos insectos, se gastarían 2 millones de dólares por año en fertilizantes suplementarios para el sector agrícola, intervenciones técnicas y multiplicación de tratamientos sanitarios para el ganado.

En los últimos años, los polímeros de impresión aparecen en la bibliografía como una alternativa de sistemas de liberación de fármacos y como mecanismos de diagnóstico y remoción de sustancias desde el cuerpo. Al elaborar un polímero de impresión para capturar la molécula que se ajusta a una plantilla concreta, en este caso la ivermectina, se pretende disminuir la muerte del escarabajo pelotero, contribuyendo a que se restablezca el equilibrio ecológico.

III. ANTECEDENTES

3.1 Parásitos

3.1.1 Garrapata *Boophilus microplus*

En los últimos años, las garrapatas son los parásitos que más daños causan en la producción ganadera.

Una de ellas y la más común es la garrapata o ácaro de nombre *Boophilus microplus*.

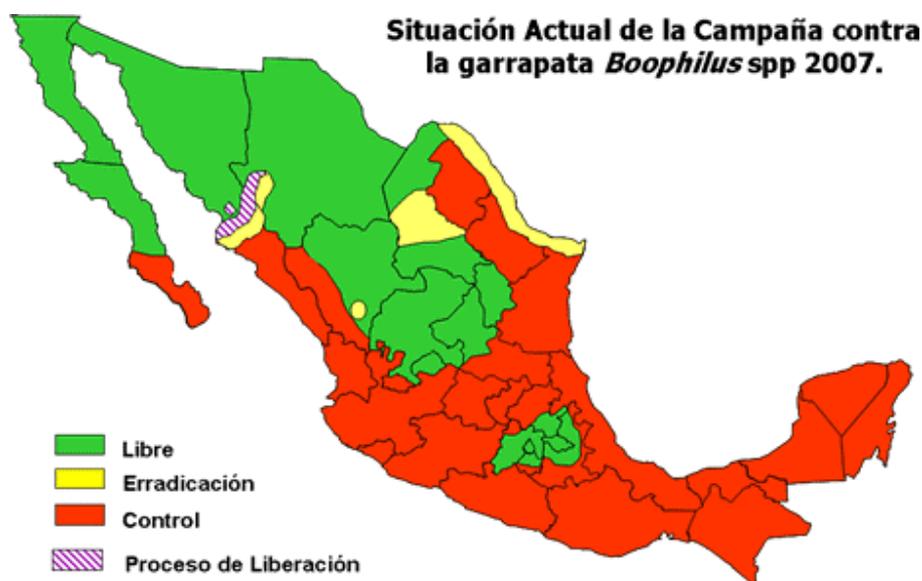


Fig. 1. Situación actual de la Campaña contra la garrapata *Boophilus* spp. 2007 en México.

La situación geográfica hasta el 2007 (Fig. 1) está referida a la fase libre que ocupa una porción importante del norte del país, así como pequeñas áreas del centro, comprende 94.4 millones de hectáreas que equivalen al 47.88% del territorio nacional. Las áreas en erradicación cuentan con 1.1 millones de hectáreas que se ubican en los espacios en los cuales el parásito ha sido eliminado por efectos de la Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus* y representa un 0.57%. Las áreas en fase de control en este momento alcanzan una superficie total de 101.6 millones de hectáreas y representan el 51.5% del país¹.

El impacto económico negativo de *B. microplus* a la ganadería se debe a efectos directos e indirectos.

El efecto directo es el resultado del daño a las pieles por acción de las picaduras, pérdida de sangre y disminución de leche y carne. Por cada 50 garrapatas pegadas en un animal, se

baja la producción de leche o de carne a la mitad y se ha encontrado que un animal puede ser infestado por más de 150 garrapatas. El efecto indirecto está dado por los agentes etiológicos que transmiten. Cada garrapata chupa 1 cc. de sangre. Además de debilitar al animal transmiten más de 50 enfermedades. Entre ellas está la tristeza o babesia, y la anaplasmosis, que parasitan la sangre y matan los glóbulos rojos, originando que el animal este decaído y anémico.

Se estima que el costo de producción ganadera alcanza entre 100 – 150 millones de dólares por año, que incluyen gastos en acaricidas químicos y medicamentos para el control de las hemoparasitosis.

Los beneficios económicos que reporta su control están en dependencia de una efectiva estrategia de control integral, donde se combine el uso racional y comprobado de los productos garrapaticidas, los efectos de la vacunación², y el adecuado manejo de los pastizales³.

3.1.2 Ciclo biológico de la garrapata

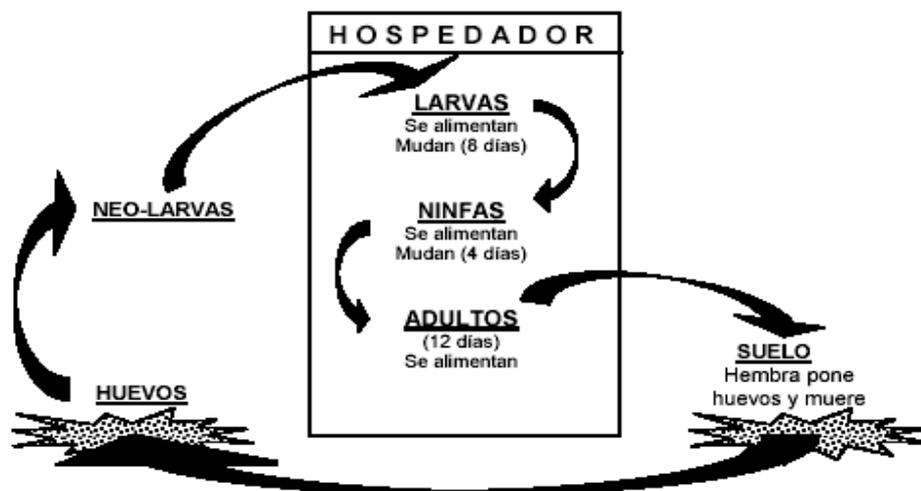


Fig. 2. Ciclo biológico de la garrapata

Como se muestra en la figura 2 las larvas están en los pastos esperando al hospedador, cuando sube al bovino, se alimenta de sangre y muda a ninfa, sigue alimentándose y muda a adultos machos (gonandros) y hembras (partenoginas), se aparean y la hembra sigue chupando sangre hasta estar repleta y se transforma en teleogina, aquí abandona al hospedador, busca un lugar protegido en el suelo y comienza la puesta de huevos (3,500 a 4,000), a partir de los huevos se originan las neo - larvas. La duración del ciclo oscila entre 20 y 41 días, siendo normalmente de 23 días y depende de la temperatura ambiente. Las larvas pueden vivir en el pasto y sin alimentarse por 180 días, si las condiciones climáticas son óptimas⁴.

3.2 Control de las garrapatas

Múltiples han sido los métodos que se han empleado para el control de las garrapatas, clasificándose en métodos químicos, biológicos, genéticos y naturales.

3.2.1 Control químico

El uso de productos acaricidas que matan a la garrapata es el medio de lucha más difundido en el mundo. Está basado en el conocimiento del ciclo biológico del parásito para evitar que haya reinfestación de la pastura por larva.

El ciclo biológico en el vacuno se completa en un periodo promedio de 22 a 23 días. Teóricamente, utilizando una acaricida eficaz (99%) cada 21 días, evitaríamos la presencia de *B. microplus* con capacidad reproductiva, logrando un control con tratamientos de rutina⁵.

La selección del producto a utilizar debe tener en cuenta el principio activo, esto es necesario para realizar una adecuada rotación de compuestos, en forma tal que no se incurra en la sobreutilización o subutilización de un producto. Se recomienda cambiar de principio activo cada cierto período de tiempo (de 4 a 6 meses).

Los productos más empleados son líquidos concentrados que contienen un principio activo contra el parásito pero que además tienen en su fórmula sustancias emulsionantes, solventes y humectantes que juegan un rol muy importante en la calidad del producto. Los principios activos más usados (Fig. 3) en la lucha contra las garrapatas han sido: organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas y piretroides sintéticos^{6,7}.

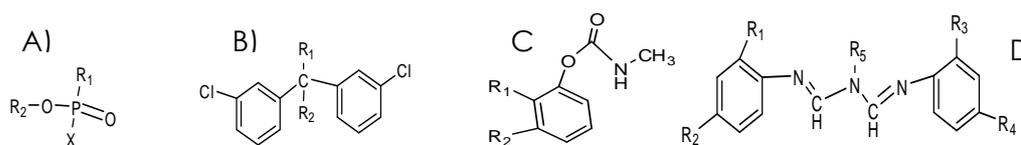


Fig. 3. Estructura base de algunos antiparasitarios: A) organofosforados, B) organoclorados, C) carbamatos y D) formamidinas.

3.2.1.1 Compuestos clorinados: son estimulantes del SNC, produciendo manifestaciones neuromusculares. Las sustancias activas son Aldrín, Hexacloruro de benceno, Clordano, Dieldrín, Endrín, Heptaclor, Metoxiclor, Toxafeno, DDT y HCH/lindano⁸.

3.2.1.2 Organofosforados: se caracterizan por inhibir la actividad de la colinesterasa, produciendo exceso de estímulo colinérgico de tipo muscarínico, nicotínico y central³. Los organofosforados son lipofílicos, se absorben a través de la piel y se acumulan en tejido adiposo donde son liberados lentamente a la sangre y otros líquidos fisiológicos (leche), por

acumulación pueden dar origen a un estado de envenenamiento crónico, motivo por lo que su uso es restringido.

A pesar de su estabilidad sobre el pelo, lana y piel, esta familia de fármacos queda primeramente en la superficie del animal permaneciendo de 4 a 8 días, pasando este tiempo el fármaco es adsorbido por la piel. Los medicamentos de mayor uso en este grupo son: Azinfosmetilo, Carbofenatión, Clorfenvinfós, Clorpirifós, Coumafós, Diazinón, Diclurvós, Dioxatión, Feniltrotion, Fentiión, Fosmet, Foxim, Malatión, Paratión, Tiofós y Triclorfón⁸.

3.2.1.3 Carbamatos: actúan de manera similar a los organofosforados inhibiendo la colinesterasa. Los principios activos más conocidos son: Carbaril, Carbofurán, Metonilo y Propoxur⁸.

3.2.1.4 Piretroides: provocan un bloqueo de la actividad motriz, incoordinación de movimientos, irritabilidad, parálisis, letargo y muerte.

Entre los fármacos más utilizados se hayan: Alletrina, Cihalotrina, Fenvalerato, Fenotrín, Flucitrinato, Permetrina y Resmetrina, Cipermetrina^{9, 10}, Deltametrina¹¹ y Flumetrina⁹. Estos tres últimos compuestos tienen efectos residuales importantes.

3.2.1.5 Formamidinas: ocasionan la muerte del ectoparásito por inhibición de la monoaminoxidasa, sus dianas más importantes son los receptores de la optopamina. El producto de mayor uso es el Amitraz³.

Los componentes anteriores (carbamatos, piretroides y formamidinas) son neurotóxicos. Sus dianas más importantes son los canales axonales del sodio (DDT y piretrinas), la acetilcolinesterasa (organofosforados y carbamatos), los receptores de la optopamina (formamidinas), y los receptores del GABA (HCH)⁸.

3.2.1.6 Otros compuestos químicos utilizados han sido los benzolifenilúreas: la mayor parte de los representantes de este grupo son altamente eficaces contra los insectos pero no contra las garrapatas³. Las sustancias con acción sobre estos ectoparásitos como el Fluazurón, se caracterizan por interferir principalmente en la formación de la quitina, impidiendo la formación de la cutícula del parásito, considerándose inhibidores de las mudas y del crecimiento¹². Por otro lado estas sustancias intervienen en el funcionamiento de las glándulas salivales, afectando la nutrición de los diversos estadios. Las células excretoras también se ven afectadas, ocasionando desequilibrios en el líquido circulatorio de los insectos³.

3.2.1.7 El Closantel (5 mg/Kg) pertenece a la familia de las salicilanilidas, también se ha empleado como garrapaticida y demostró eficaz protección sobre formas inmaduras de *B.microplus* y reducción en la eclosión de los huevos de hembras tratadas. Ofrece además,

buena protección vía SC (6 semanas para *Amblyomma*) y por vía oral a igual dosis a los parásitos presentes en el animal⁸.

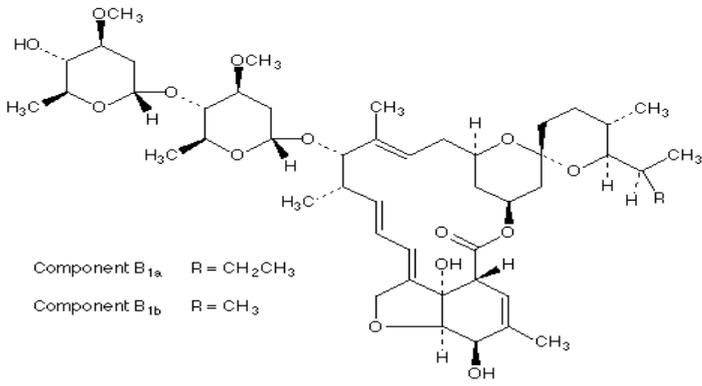
3.2.1.8 La reducción progresiva del volumen de acaricida utilizado es posible mediante la utilización de acaricidas de acción sistémica administrados por vía oral o subcutánea¹². Entre los garrapaticidas sistémicos encontramos los derivados de las lactonas macrocíclicas, los cuales han demostrado tener acción sobre garrapatas de uno y tres hospederos.

La ivermectina es uno de estos compuestos y aplicada a 200 microgramos/Kg en inyección SC controla las garrapatas¹². Otros derivados de la ivermectina, como moxidectina y doramectina, están siendo desarrollados con buenas perspectivas para su uso como garrapaticida¹³.

Los macrólidos han revolucionado el control de los parásitos tanto en el hombre como en los animales. La ivermectina es el producto mejor conocido de esta clase que incluye las avermectinas. Comercialmente han vencido a la competencia; muchos fármacos convencionales que eran competidores directos de esta clase de productos han dejado de ser de uso habitual, y finalmente, han dejado de fabricarse. Muchos productos antiguos han sido víctimas de “la revolución macrocíclica”¹⁴.

Las avermectinas y las milbemicinas son hoy los antiparasitarios más utilizados, con una cifra del orden de mil millones de dólares americanos en 1993. Así, desde 1981, la ivermectina ha sido comercializada en más de 60 países y es utilizada para tratar tanto el ganado bovino, caprino, caballos, cerdos, perros, camellos y hasta el hombre¹⁵.

3.2.1.8.1 Ficha técnica de la Ivermectina

Ivermectina	 <p>Component B_{1a} R = CH₂CH₃ Component B_{1b} R = CH₃</p>
Nombre químico	5-O-dimetil-22-23-dihidroaivermectina A _{1a}
Fórmula	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₄
Peso molecular	875.1 g/mol
Aspecto físico	Cristales incoloros
Solubilidad en agua	4 mg/L
Punto de fusión	

Este principio activo fue introducido en el mercado en 1981; es un derivado del grupo de las lactonas llamado Avermectinas (aisladas en 1979), producto de una fermentación natural del hongo *Streptomyces avermilitis*. La ivermectina contiene al menos el 80% de 22,23-dihidroaivermectina B_{1a} y menos del 20% de 22,23-dihidroaivermectina B_{1b}.

Es un agente antiparasitario en varias especies animales. Este compuesto es también usado en agricultura y en los seres humanos para una enfermedad del trópico conocida como oncocercosis.

3.2.1.8.2 La absorción, distribución, metabolismo y excreción han sido estudiados en diferentes especies¹⁶.

Este fármaco se emplea bajo diversas fórmulas y dosis, así como en diferentes modos de administración. En inyección subcutánea y formulación no acuosa, a la dosis de 0.2 mg/kg, la persistencia de la ivermectina en el plasma del animal presenta una vida media de 3 días. La dosis es mayor en la formulación “pour-on” no acuosa (0.5 mg/kg). Por último, la administración de la ivermectina en formulación acuosa bajo la forma de un bolo intestinal (sustained-release bolus) que libera durante más de 4 meses la ivermectina es aproximadamente 12.7 mg/día¹⁷.

Distribución: La concentración de ivermectina en los líquidos corporales permanece por periodos prolongados. La concentración más baja del compuesto se observó cuando había contenido gástrico, y por otro lado, se vieron altas concentraciones en moco y contenido intestinal. Su amplio volumen de distribución indica la alta cantidad del compuesto encontrado en los diferentes tejidos, incluyendo la piel.

Metabolismo: La ivermectina en la mayoría de los animales tiene una vida media terminal larga, por ejemplo, en ovejas de 2-7 días. Se metaboliza hepáticamente por vía oxidativa.

Excreción: La ivermectina se elimina por bilis independientemente de la vía de administración, por eso se detectan altas cantidades en heces, aunque también se excreta por orina y leche.

La mayor concentración de residuos está presente en el hígado y en el tejido graso. La mayor vía de excreción es la vía fecal en todas las especies estudiadas y solo el 2% es excretado por orina.

Mecanismo de acción: El mecanismo de acción de la ivermectina es completamente diferente al de otros antiparasitarios, involucra a un compuesto químico que envía señales de una neurona a otra, o de una neurona a una célula muscular (GABA, ácido gamma aminobutírico). La ivermectina en los nematodos y artrópodos estimula la liberación del GABA de la terminal sináptica y refuerza la unión hacia los receptores sinápticos, lo que interrumpe el impulso nervioso normal produciendo la parálisis del parásito, el cual finalmente muere.

3.2.1.8.3 Límites máximos de residuos y toxicidad

En cuanto a la toxicidad del compuesto en estudios realizados por el Comité de Expertos, se determinó la cantidad de residuos que un ser humano puede ingerir sin que tenga efectos indeseables para la salud (IDA), ésta es de 0.1 µg/kg de peso vivo. Con base a lo anterior los límites máximos de residuos (LMR) considerados como seguros para el consumo humano son en hígado 100 µg/kg, grasa 40 µg/g y en músculo 10 µg/kg.

Los signos clínicos de toxicidad de la ivermectina cuando es administrada en concentraciones mucho más altas de las indicadas o en animales muy sensibles dependen de la especie pero en general se presentan efectos a nivel del sistema nervioso central como dilatación de pupilas, problemas de locomoción (ataxia), temblores, parálisis, convulsiones y muerte¹⁶.

Las garrapatas que se alimentaron del ganado que recibió ivermectina muestran un desarrollo incompleto de sus ovarios. Dado que estas garrapatas no se alimentan hasta estar totalmente ingurgitadas, se piensa que el efecto se debe a la ingurgitación parcial y no a esterilización. Si se lograra diseñar una forma de liberación prolongada que mantenga concentraciones garrapaticidas o esterilizantes durante un tiempo prolongado, esto podría

funcionar “limpiando” a los animales y pasturas, dado que las larvas que se incorporaran a los animales serían afectadas por la concentración circulante de ivermectina¹⁸.

3.2.1.8.4 Estudios realizados con ivermectina.

A continuación se mencionan algunos estudios realizados con diferentes sistemas de administración encontrados en la bibliografía.

La evaluación de la eficacia de la ivermectina aplicada tópicamente contra la garrapata *Boophilus microplus*, en dosis de 200, 500 y 1000 µg/kg, teniendo un grupo control (sin tratamiento) y sumado a este estudio una comparación de una formulación inyectable por vía subcutánea (200 µg/kg), dio como resultado basado en el número de garrapatas hembras engordadas (alimentadas de sangre del ganado) que la ivermectina aplicada tópicamente en dosis de 200, 500 y 1000 µg/kg presentaron el 50, 85 y 91% respectivamente, mientras que la ivermectina administrada por la vía subcutánea fue del 80%. Con lo que respecta a la reproducción de la garrapata fue reducida por un 84, 94 y 95% respectivamente y por vía subcutánea fue 94%, no existe una diferencia significativa entre las dosis de 500 y 1000 µg/kg (aplicación tópica) contra 200 µg/kg vía subcutánea¹⁹.

La eficiencia de un tratamiento con ivermectina (Ivomec ® inyectable) o moxidectina fue determinada por la administración de una inyección por vía subcutánea en una dosis de 200 µg por kg en ganado infestado con garrapatas en diferentes etapas de desarrollo, dando como resultado un porcentaje de reducción del 94.8 y 91.1% respectivamente. La capacidad de reproducción de las garrapatas se redujo hasta un 99%. Los resultados indican que ambos endectocidas fueron 99.7% efectivos contra garrapatas adultas o en etapa de ninfas²⁰.

3.2.2 Control biológico.

Como se ha comentado con anterioridad, los productos químicos para el control de garrapatas es cada vez menor debido a los altos costos de desarrollo y a la aparición de problemas de resistencia que los deja fuera del mercado. Dicha situación, sumada al impacto ambiental que conlleva la eliminación de estos productos del medio, da como resultado la necesidad de desarrollar nuevos métodos de control, destacándose el empleo de vacunas recombinantes contra las garrapatas.

El desarrollo de vacunas contra la garrapata *B. microplus* fue reportado por primera vez en Australia donde la proteína BM86, aislada del intestino de la garrapata, fue recombinada en *Escherichia coli* y llevada a escala mundial bajo los nombres de Tick Gard ®²¹.

Este antígeno permanece en forma natural "oculto" al sistema inmunológico del animal, es decir, no juegan ningún papel en la interacción hospedero-parásito para inducir de forma artificial la inmunidad del hospedero²².

La ventaja de usar antígenos ocultos está en evitar los principales mecanismos de evasión parasitaria de la respuesta inmune. La falta de contacto entre los antígenos ocultos y el sistema inmunológico permite que los parásitos no desarrollen estrategias para escapar a la acción de una respuesta contra ellos, esto los hace especialmente atractivos para el diseño de vacunas contra ectoparásitos²³.

Posteriormente, investigadores cubanos, empleando básicamente la misma tecnología, pero recombinando la proteína en la levadura *Pichia pastoris*, produjeron una vacuna denominada Gavac ® (CIGB, Cuba), la cual tiene registro para su aplicación en varios países de Latinoamérica como Colombia, Bolivia, Brasil, México, además de encontrarse en fase de registro en otros países de la región²⁴.

Los anticuerpos específicos contra este antígeno que se obtienen en los animales vacunados, junto con otros componentes como el complemento, son ingeridos por las garrapatas junto con la sangre; esto favorece que los anticuerpos se unan al antígeno provocando el daño intestinal y el paso de las sustancias a la hemolinfa del parásito. Ello resulta finalmente en la reducción del número de garrapatas que completan el ciclo biológico y se afecta la fertilidad de los parásitos resultantes.

Por lo tanto el resultado fundamental de este inmunógeno no será la muerte directa de la garrapata en una sola generación, sino el control progresivo del número de garrapatas en generaciones sucesivas mediante la reducción de la capacidad reproductiva de estos parásitos²⁴.

El inmunógeno Gavac es utilizado en Cuba para el control de la garrapata *B. microplus* en el ganado bovino. El esquema de aplicación involucra una primera inmunización en las semanas 0, 4 y 7, con revacunaciones cada 6 meses. En los rebaños que pierden el esquema de inmunización por diversas razones se requiere, el reinicio de la inmunización con una prima inmunización de tres dosis. Cada dosis vacunal lo constituye 2 ml de Gavac, que contiene 100 microgramos del antígeno²⁵. Recientemente se ha ensayado una nueva formulación denominada Gavac Plus, la cual se elaboró a partir de la misma fórmula inicial de Gavac pero obtenida mediante un proceso de purificación más perfeccionado. Su eficacia es superior al Gavac, produciendo mayores títulos de anticuerpos²⁴.

Otra formulación que se ha venido desarrollando es la TickVac MK, la cual emplea un antígeno crudo obtenido de la totalidad de la proteína natural de larvas de *B. microplus*²⁶.

El desarrollo de vacunas contra un número de ectoparásitos sigue en continuo apogeo, considerando las vacunas que anteriormente se mencionaron hoy en día se tiene la vacuna SBm7462 contra la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*²⁷ donde los resultados indican que la secuencia en los epitopes de dicha vacuna son conservados en poblaciones del

sur de América, la conservación de tales secuencias es muy importante en la respuesta inmunológica de diferentes poblaciones de *R. (B) microplus*. Otro avance es el aislamiento de una proteína obtenida desde la etapa de huevo de la garrapata *R. (B) microplus* llamada BYC, induciendo una significativa respuesta inmune en el ganado²⁸. Y las vacunas conteniendo el DNA recombinante Bm86, Ba86 y Bd86 secretadas en *P.pastoris* para el control de infestaciones de garrapatas en África²⁹.

3.2.3 Control genético.

Este método se basa en la utilización de razas que muestran más resistencia a las garrapatas. En términos generales se puede definir como la aptitud del huésped para imponer limitaciones sobre el parásito en cualquier etapa de su relación³. La resistencia es adquirida como respuesta al ataque de garrapatas y dura toda la vida. Aumenta con la densidad de garrapatas y es hereditaria. Los terneros que nacen de madres resistentes están protegidos hasta el destete.

Es posible desarrollar rebaños *Bos taurus* resistentes a partir de individuos excepcionalmente resistentes, pero se necesita muchos años para lograrse. La resistencia puede conseguirse más rápidamente a partir de entrecruzamientos con bovinos *Bos indicus*. En general se considera que se necesita de un 50 % de sangre de *Bos indicus* para lograr una resistencia adecuada⁷.

3.2.4 Control físico o natural.

Se ha comprobado que *B. microplus* en su etapa de vida libre depende en gran manera de las condiciones externas de humedad y temperatura, por lo que pastoreos intensivos, reducen la cobertura vegetal y pueden limitar la sobrevivencia de huevos y larvas. Tiene influencia la composición del tapiz vegetal donde cae la hembra repleta para encontrar esa protección; es así que campos sucios con arbustos y malezas proporcionan condiciones favorables para que *B. Microplus* complete su ciclo biológico. Investigaciones realizadas en Colombia determinan que la supervivencia larvaria de la garrapata fluctúa entre 30 y 60 días promedio, resultados que permiten recomendar un manejo rotacional de potreros con periodos de descanso no menos de 30 días, siendo el ideal de 45 días³.

Es importante tener en cuenta que la mejora del pasto tiene un efecto indirecto, ya que al mejorar el estado nutricional de los animales, éstos pueden desarrollar la capacidad de soportar mayores cargas parasitarias sin pérdidas de producción⁷.

En la actualidad se ha corroborado que ninguno de los métodos explicados anteriormente, aplicados de forma aislada, resultan totalmente eficaces en el control de los ixódidos^{12, 30}. Sin embargo Polanco (2001)³¹ refiere que sólo un manejo integrado donde se combinen

armónicamente los diferentes métodos, resulta verdaderamente efectivo en el control de estos ectoparásitos.

3.2.5 Resistencia

El principal problema del uso de las sustancias químicas contra las garrapatas es la aparición de resistencia a los ixodicidas y la reaparición del parásito en zonas ya limpias, situación que dificulta las campañas de lucha⁵.

La resistencia desarrollada por las garrapatas se ha manifestado frente a casi todos los grupos químicos utilizados en su control; esto ha ocurrido preferentemente en áreas donde la utilización de acaricidas ha sido más sistemática²⁶. Este fenómeno crea la necesidad de realizar investigaciones epidemiológicas determinando la dinámica de la población del parásito a través de conteos de garrapatas y estudios ecológicos; así como la búsqueda de nuevas alternativas de control⁹.

La resistencia en la garrapata común del ganado bovino, *B. microplus*, fue reportada por primera vez en Australia en el año 1937, en Sudáfrica en el año 1938, en 1947 en Argentina, en Brasil en 1950 y en México en 1981.

La frecuencia con que ha aparecido la resistencia de *B. microplus* a muchos grupos de acaricidas, ha hecho pensar que se ha llegado a un momento crítico, en donde hay que prever la resistencia de las garrapatas a los 5 o 10 años de la primera aplicación de cualquier nuevo tipo de acaricida³.

Esta realidad y el hecho de que el desarrollo de nuevos acaricidas es cada vez más complicado y costoso, hace que resulte imperioso contar con estudios que permitan alargar al máximo su vida útil. El buen uso de los productos para baños acaricidas es importante pues en el lapso que va entre su aparición en el mercado y el desarrollo de resistencia del parásito es cada vez menor con los nuevos productos²⁶.

3.2.5.1 Caracterización y distribución de la resistencia de garrapatas *B. microplus* en México.

Existe un patrón de desarrollo exponencial entre el descubrimiento de nuevos insecticidas y el desarrollo de especies resistentes a estos nuevos productos, que se caracteriza por ocurrir a través de los años en menos período de tiempo: para DDT (dicloro difenil dicloroetano) la resistencia se presentó 6 años después de salir al mercado, lindano 5 años, organofosforados (OF) 4 años, carbamatos 2 años y piretroides sintéticos (PS) 2 años.

Cepas resistentes a Organofosforados (OF) y organoclorados (OC)

Cepa Tuxpan, fue la primera evidencia de resistencia a ixodicidas en México. Se aisló en 1981 en el Municipio de Tuxpan, Veracruz y presentó su patrón de resistencia a OF.

Cepas resistentes a piretroides.

En México las cepas de garrapatas resistentes a PS fueron detectadas en seis muestras analizadas durante 1993. Las dos primeras fueron remitidas del Municipio de Soto de la Marina, Tamaulipas, otras tres del Municipio de Emiliano Zapata, Tabasco, y la última de San Juan Evangelista, Veracruz.

Cepa Mora, originaria del municipio de Emiliano Zapata, Tabasco y la cepa San Jorge, originaria del Municipio de Soto la Marina, Tamaulipas. Ambas cepas fueron caracterizadas con un comportamiento de multiresistencia, con moderada resistencia a OF y elevada a PS. De tal forma que la respuesta moderada de la cepa “Mora” hacia los OF es similar al comportamiento de la cepa tipo “Tuxpan”; pero además, presentó altos niveles de resistencia para flumetrina, seguida de la cipermetrina y por último para deltametrina.

Se reportaron otros dos patrones de respuesta: cepa Coatzacoalcos se distribuye en zonas ganaderas del sur del Estado de Veracruz y presenta una respuesta de resistencia moderada a cipermetrina y muy baja a deltametrina.

Cepa Aldama, originaria del sur de Tamaulipas presenta una respuesta de resistencia moderada a flumetrina y deltametrina.

En el 2002 se notificó resistencia a Amitraz en Tabasco presentando la cepa San Alfonso también resistente a organofosforados y piretroides³²⁻³⁴.

Tratando de entender porque cada vez es más difícil de matar a la garrapata, es de destacar el caso de la *cipermetrina* que fue la sustancia principal utilizados por los ganaderos.

CEDIVE (Centros de Estudios, Diagnóstico e Investigación Veterinaria) en los primeros resultados del estudio sobre la resistencia al ácaro *Boophilus microplus*, encontró un 12 por ciento de sobrevivencia a la Cipermetrina. Quiere decir que de 100 garrapatas rociadas con el piretroide, 12 quedaron vivas.

Dicho de otra manera, de cada cinco mil garrapatas nacidas de una sola garrapata, murieron unas 4,400 y 600 quedaron vivas. Cada hembra hija superviviente, que llegó a repletarse de sangre, puso como mínimo cinco mil huevos. Al fumigar a las nietas de éstas, no murieron por el acaricida hecho a base de Cipermetrina. Eso significa que a las hijas de estas nietas y a su descendencia, la Cipermetrina no les hará ningún efecto³⁵.

3.3 Sistemas de liberación controlada (SLC)

Uno de los logros tecnológicos más importante del siglo XX es el desarrollo de fármacos cada vez más eficaces en el control de una amplia gama de especies parasitarias. Para la

industria farmacéutica este constante desarrollo de productos químicos es cada vez más preocupante por el frecuente desarrollo de resistencias y, en consecuencia, la presencia de residuos en productos de origen animal. Normalmente, la presencia de residuos del fármaco es la respuesta en el aumento en la frecuencia de aplicación y/o dosis del principio activo, lo cual puede repercutir en el comercio internacional.

En 1997, las ventas mundiales de endoparasiticidas (36%), endectocidas (25%) y ectoparasiticidas (39%) fueron de 3100 millones de dólares. Una pérdida moderada de eficacia (generalmente no visualizada a nivel de campo) representa fuertes pérdidas en términos de costo/eficacia del antiparasitario.

En 1956 se evaluaron alrededor de 1800 compuestos, mientras que en 1984 se probaron 22000.

Nari y Hasen (1999) informan que el costo de desarrollo de un nuevo pesticida es de 100-230 millones de US dólares, en un proceso que puede tomar más de 10 años desde el descubrimiento de un candidato a su disposición en el mercado³².

Una estrategia que se puede considerar viable para el desarrollo de preparados contra ectoparásitos es el rediseño de principios activos ya existentes en preparados farmacéuticos estratégicos de liberación controlada, sistemas capaces de conducir el fármaco a su lugar de acción y, una vez allí, liberarlo de forma controlada. Estos parecen, a priori, los sistemas de liberación más prometedores para la administración de moléculas de la biotecnología y moléculas con índices terapéuticos estrechos. Aunque las formas farmacéuticas convencionales y las tecnologías de liberación menos sofisticadas seguirán teniendo un papel importante en la formulación y fabricación de medicamentos.

Paul Ehrlich, finales del siglo XIX y principios del XX; concebía la posibilidad de lograr “balas mágicas” que reconocieran específicamente el lugar de acción y eximiera de la misma el resto del organismo, logrando así una mayor efectividad y menor incidencia de efectos no deseados.

Los sistemas de liberación avanzan hacia tecnologías que garanticen mayor seguridad y comodidad para el paciente.

Así, la forma farmacéutica con mayor índice de crecimiento es el parche para liberación prolongada, que duplica su presencia en el mercado cada ciclo de cuatro años.

El cáncer y la neurología han sido las áreas más beneficiadas de este gran auge tecnológico. La insulina inhalada supone el ejemplo más reciente de la investigación en tecnologías de liberación³⁶.

3.4 SLC poliméricos.

Muchas han sido las tecnologías desarrolladas hasta la fecha para el diseño inteligente de sistemas de liberación de fármacos, tanto en el campo humano como veterinario, desde sistemas moleculares, pasando por coloides y hasta células transportadoras.

La necesidad del control prolongado en patologías de animales silvestres ha dado lugar a la utilización de sistemas económicamente viables que liberen el activo lentamente, a efectos de que el control se ejerza durante largos períodos.

La mayoría de los sistemas de liberación de fármacos enfocados en el área veterinaria estaban fabricados de polímeros no degradables tales como la silicona, poliuretanos y copolímeros de etileno-venilacetato, considerados económicos, biocompatibles, biológicamente inertes y aceptados por una aprobación regulatoria. En años recientes el interés por polímeros biodegradables como sistemas de liberación de fármacos en el campo animal, ha desarrollado gran importancia. La razón de este interés por utilizar esta clase de polímeros es que no requiere ser removido el dispositivo desde el animal al finalizar el periodo de tratamiento debido a su degradación que ocurre al estar en contacto con los componentes fisiológicos. Esto acarrea beneficios tales como la reducción de estrés en el animal y reducción de costos en términos de tiempo por el uso final del sistema.

Los polímeros más atractivos y comúnmente utilizados son los poliésteres tales como ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-glicólico (PLGA) y poli-ε-caprolactona (PCL).

El alcance y el desarrollo de nuevas entidades para el control de parásitos tienen un incremento significativo, ejemplo: las microesferas de PLGA (copolímero 50:50 y 90:10) conteniendo ivermectina obtenidas por la técnica de evaporación de solvente, y también la utilización de PLA para la realización de las mismas³⁷.

La eficacia de la ivermectina desde un bolo de liberación sostenida por 90 días arroja que existe una disminución en el número de garrapatas de otras especies, excepto para *Boophilus microplus*, así mismo no hay reacciones adversas atribuidas a la ivermectina contenida en el bolo de liberación sostenida³⁸.

La eficacia de microesferas inyectadas (PLGA 50:50 y 65:35) conteniendo un 30% de ivermectina para el control de garrapatas, obtuvo como resultados una pérdida de garrapatas en la pastura y el ganado que fue tratado recuperó 35 kg de peso comparado con el animal que no recibió tratamiento^{39,40}.

La aplicación de sistemas de liberación prolongada que contienen PLGA (ácido poliláctico-glicólico) y PLA con ivermectina necesita ser administrada con menor frecuencia que un sistema de bolo (IVOMEK ® SR). Es más, la cantidad total de ivermectina necesaria para el control de los ectoparásitos fue reducida usando las micropartículas en comparación con el sistema del bolo intraruminal⁴¹.

La aplicación de pellets a base de ivermectina ha sido utilizada en animales silvestres de vida libre, a efectos de espaciar sus tratamientos. Pellets conteniendo alrededor de 600 mg de ivermectina han sido implantados en animales con el objetivo de obtener una pauta de liberación muy sostenida.

Este tipo de administración ha sido utilizado experimentalmente y monitorizado clínicamente, con excelentes resultados.

En las nanopartículas (sólidos coloidales entre 10 y 1000 nm) podemos diferenciar dos grandes grupos: las nanoesferas (NE) y las nanocápsulas (NC), las cuales se diferencian en su constitución, ya que mientras que las NE están formadas de una densa matriz polimérica, las NC se componen de una membrana polimérica que recubre un centro líquido oleoso. Desde el punto de vista farmacéutico, las NC son atractivas porque su cavidad central basadas en aceite, permite un alto nivel de encapsulación para sustancias lipofílicas^{42,43}.

3.4.1 Métodos de obtención de NCs

3.4.1.1 *Polimerización interfacial*, que involucra una reacción de polimerización que ocurre en la interfase entre los nanoglóbulos de aceite que contiene la sustancia activa y una fase acuosa^{44,45}.

3.4.1.2 *Desplazamiento de solvente*, que consiste en disolver una fase oleosa y el polímero de recubrimiento en un solvente polar. Esta fase se vierte en una fase acuosa bajo agitación magnética, formándose las NC debido a la rápida difusión de la fase orgánica en la acuosa, lo que provoca una emulsificación espontánea. La subsecuente adición del polímero sobre las nanogotas de aceite provocará la formación del sistema vesicular^{44,46}.

3.4.1.3 *Emulsión- evaporación*, el polímero y el fármaco se disuelven en un disolvente orgánico que sea inmisible en agua (Ej. Diclorometano), esta disolución es emulsificada con agitación en una fase acuosa que contiene tensoactivos necesarios para estabilizar la emulsión formada. La emulsión se somete a la acción de un equipo de ultrasonido o un homogenizador con la finalidad de reducir el tamaño de partícula. Posteriormente el disolvente es removido mediante calor y vacío. La remoción del disolvente da como resultado la formación de una fina dispersión de nanoesferas.

3.4.1.4 *Emulsificación-difusión*, es un proceso en el que se forma una emulsión aceite/agua entre un solvente parcialmente soluble en agua (el cual ha sido previamente saturado y contiene disueltos el polímero y la sustancia activa), y una fase acuosa saturada del solvente y que contiene uno o varios estabilizantes. La adición de agua a la emulsión provoca rompimiento del equilibrio y la salida del solvente a la fase continua con la subsecuente agregación del polímero sobre el aceite en forma de NC^{44,46-52}.

3.4.1.5 *Emulsificación- difusión por desplazamiento de solvente*

El método de emulsificación-difusión es capaz de preparar nanocápsulas de una manera sencilla, eficiente y reproducible. Este método es preferible de otras técnicas para la elaboración de NC tal como emulsificación- evaporación de solvente y nanoprecipitación. La técnica de emulsificación- evaporación requiere trabajar con solventes tóxicos, mientras que el método de nanoprecipitación produce bajos rendimiento y encapsulación.

El mecanismo de formación de las nanocápsulas por el método de emulsificación-difusión es explicado por una inestabilidad química producida por el transporte del solvente. Así, la difusión del solvente desde los glóbulos del aceite dentro del agua acarrea moléculas de aceite y polímero, formando regiones localmente supersaturadas. Siendo estas regiones no persistentes provocando la formación de nanogotas de aceite, polímero y principio activo y rápidamente estabilizada por el agente activo en la superficie⁵³.

3.4.2 Caracterización de las nanocápsulas

Las nanopartículas obtenidas por cualquiera de los procedimientos descritos deben ser caracterizadas y controladas de acuerdo con unos ensayos que aseguren su calidad y homogeneidad, así como su comportamiento biofarmacéutico (liberación).

Ensayos característicos que se suelen realizar a las nanopartículas:

3.4.2.1 Tamaño de partícula: Se realiza mediante PCS (Espectroscopia de correlación de fotones) o LD (Difracción láser). PCS evalúa la fluctuación de la intensidad de la dispersión de la luz originada por el movimiento de las partículas. LD se fundamenta en el ángulo de difracción de la luz originado por las partículas, a menor tamaño se observan ángulos más grandes. Los equipos miden el tamaño de partícula de acuerdo a la intensidad, volumen y número^{47, 48, 51}.

3.4.2.2 Potencial zeta: El potencial zeta puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides. La evaluación de este parámetro ayuda a predecir la estabilidad de las dispersiones coloidales. La medición se basa generalmente en la movilidad electroforética.

3.4.2.3 Morfología: Se utiliza *Microscopía electrónica*, la técnica esencialmente consiste en hacer incidir en la muestra un haz de electrones. Este bombardeo de electrones provoca la aparición de diferentes señales que captadas con detectores adecuados, nos proporcionan información acerca de la naturaleza de la muestra (tamaño y forma)⁴⁷⁻⁵¹.

3.4.2.4 Comportamiento térmico, se hace por *Calorimetría Diferencial de Barrido* (DSC). Se mide la variación en el flujo de calor entre la muestra y la referencia cuando dicha muestra se somete a un programa de temperatura en una atmósfera controlada. El análisis térmico puede proporcionar las propiedades de cristalinidad de las partículas así como las interacciones fármaco-lípido y la modificación que presenta con respecto al lípido y el

fármaco después de someterse a una técnica para la formación de las nanocápsulas. También puede ser un indicador de la estabilidad de las nanocápsulas formadas a través del tiempo. Se puede presentar la desaparición, disminución y corrimiento de picos de fusión u otros procesos dependientes de la temperatura⁴⁷.

3.4.2.5 Densidad de gradiente: es una forma de caracterizar cualitativamente al sistema en base a la densidad que presenta el mismo, de acuerdo a esta propiedad la formación de las nanocápsulas queda evidenciada al encontrarse dicho sistema entre la nanoemulsión y las nanoesferas en ese gradiente de densidades^{48, 49}.

3.5 Impacto ambiental de la ivermectina

Impacto ambiental de la ivermectina eliminada por el ganado sobre la coprofauna y la degradación de la materia fecal en pasturas.

Como ya se ha mencionado, la ivermectina es un antiparásito endocíclico, utilizado ampliamente en el control de nemátodos artrópodos que afectan a los bovinos.

La elevada proporción de principios activos eliminados a través de la materia fecal interfiere en la colonización y la degradación de las heces, originando efectos letales y subletales por acción del principio activo sobre organismos coprófagos no perjudiciales para los bovinos y los efectos indirectos del fármaco sobre parásitos de la mosca doméstica, hecho que evidencia no sólo el gran espectro de acción de la ivermectina, sino también el riesgo potencial de toxicidad para organismos que interactúan con la coprofauna aunque no desarrollen actividad coprófila. La ivermectina conserva toda su eficacia insecticida durante un largo periodo. Así, Wardhaugh y Rodríguez- Menéndez (1988) han demostrado que los insectos coprófagos podrían intoxicarse todavía si consumen heces de animales tratados 40 días antes.

Sin embargo una de las circunstancias preocupantes en las actividades agropecuarias es el tiempo de degradación de las heces, ocasionando perjuicios económicos por el desaprovechamiento de áreas de pastoreo (consecuente incorporación de nutrientes a suelo). En la naturaleza existen los cocos o escarabajos coprófagos que ayudan a la disminución de esta materia orgánica⁵⁴.

En este sentido, los escarabajos estercoleros tienen un importante papel, dada su capacidad de incorporación de heces al suelo. Normalmente los escarabajos hacen pequeñas pelotas, las cargan y las entierran en las cercanías, formando estructuras en las cuales depositan un huevo. La larva resultante de éste huevo se alimentará de heces del bolo formado hasta el estadio adulto, cuando sale para completar su ciclo biológico. Su contribución puede ser sintetizada de la siguiente forma:

- a) Mantenimiento de la fertilidad del suelo, debido a la contribución del reciclaje de nutrientes retirados de las pasturas, especialmente el nitrógeno.

- b) Creación de espacios que faciliten la infiltración del aire y agua, debido a las pequeñas excavaciones y túneles en su interior.
- c) Limpieza en las pasturas, por el entierro de bolos fecales, con esto se eliminan las restricciones al pastoreo y aumentando la utilización efectiva del área.
- d) Disminución de las infestaciones de las moscas de los cuernos y parásitos gastro-intestinales, por la destrucción y entierro de los bolos fecales.
- e) Contribución para el uso racional de vermícidias e insecticidas en el control de parásitos gastro-intestinales y mosca de los cachos, disminuyendo su necesidad y posibles riesgos de contaminación ambiental.
- f) Demostración de que no existe trabajo sin importancia en la naturaleza, resaltando al hombre y su responsabilidad como modificadora o mantenedor de ese equilibrio, del cual depende directamente nuestra sobrevivencia.

El valor económico de los insectos de coprófagos es muy alto, solo para los Estados Unidos de América se ha estimado que, en ausencia de estos insectos, se gastarían 2 millones de dólares por año en fertilizantes suplementarios para el sector agrícola, intervenciones técnicas y multiplicación de tratamientos sanitarios para el ganado⁵⁵.

3.6 Polímeros molecularmente impresos.

3.6.1 Historia

Hace más de tres décadas en la universidad de Lund, se desarrolló un tipo de “redes de pesca” que funcionaban a escala nanométrica, capacitadas para atrapar células vivas e, incluso entidades biológicas más pequeñas como enzimas y otras moléculas.

La técnica resultó atractiva en decenas de aplicaciones. Por ejemplo para producir ácido aspártico, un aminoácido utilizado en la preparación de varias medicinas, se usan hoy redes plásticas que contienen células de *Escherichia coli*. En la industria alimentaria, la conversión de azúcar glucosa en fructosa, mucho más dulce, se realiza mediante una enzima específica insertada en un material plástico. Y, continúan apareciendo campos de aplicación para estas trampas, incluido el médico.

Pero la herramienta original de la red presenta solo un primer intento de desarrollar técnicas que sumen las ventajas de plásticos y moléculas. Superan el medio millar los investigadores que, en diversas partes del mundo, ensayan las aplicaciones de una segunda técnica, la del moldeado molecular, en cuyo desarrollo desempeñe un papel crucial.

De forma general, las partículas plásticas u otras estructuras se cubren con impresiones de

moléculas específicas y dichas impresiones se utilizan para propósitos concretos. Una vez perfeccionada, esta técnica podía tener aplicación en muchas áreas, incluso en el sector alimentario, que ve el beneficio de su capacidad para eliminar contaminantes como el veneno de aflatoxina producida por un hongo. Las nuevas herramientas han comenzado también a despertar gran interés en el campo biomédico, ya que podrían acelerar las etapas iniciales del descubrimiento de medicamentos, ser utilizadas en la separación y purificación de fármacos y contribuir al desarrollo de dispositivos médicos y herramientas de diagnóstico.

Todo se originó al iniciar con el estudio de métodos para inmovilizar enzimas y células, preguntándose que ocurriría si se modificaba la técnica “de pesca” original, de modo que la red moldeara alrededor de las moléculas capturadas y permitiera posteriormente eliminar las moléculas capturadas mediante un “lavado” dejando cavidades perfectamente o moldes de ellas mismas. ¿Dejarían estas impresiones que otras moléculas del mismo tipo que las originales encajarán en estos huecos? La respuesta es sí, los moldes podrían ser útiles para distintas tareas, una de ellas, para el aislamiento de moléculas seleccionadas a partir de mezclas de compuestos (pues solo las moléculas que poseen la misma forma y los grupos químicos correctos encajarían cómodamente en las cavidades).

A lo largo de más de veinte años, se han realizado una serie de experimentos con objeto de desarrollar esta segunda técnica. Realizando lo que se denominó “investigación de cortina de humo”. En primer lugar, mezclar las moléculas de interés (lo que se denominara como plantilla) con los bloques de construcción de los plásticos. Estas unidades también llamadas monómeros, crean una malla plástica alrededor de cada plantilla. A continuación se extraen las plantillas con ayuda de un disolvente, obteniéndose un material salpicado revestido de plástico que posee una “memoria” de los contornos y distribuciones de carga de los grupos químicos de la molécula biológica original.

Los moldes plásticos, llamados polímeros de impresión molecular, MIP (molecularly imprinted polymers), poseen diversas características que los hacen atractivos, resultan económicos, ya que se requiere relativamente poco tiempo para producirlos y los monómeros plásticos son baratos. Además pueden ser estables durante mucho tiempo, incluso en condiciones extremas.

Una de las muchas utilidades potenciales de los MIP es la eliminación de sustancias indeseadas en la sangre. De este modo, se podría disponer los moldes moleculares de las sustancias en cuestión contenidos en partículas poliméricas empaquetadas en tubos. Por ejemplo un paciente con los riñones dañados podría utilizar un tubo colocado en un dispositivo fuera de su cuerpo para eliminar una sustancia dañina de su torrente sanguíneo. A medida que la sangre pasará a través de una vía intravenosa dispuesta entre una vena y el tubo exterior con los MIP, las partículas poliméricas atraparían la sustancia seleccionada y el suero limpio estaría de nuevo en el torrente circulatorio.

Este tipo de tratamiento utilizado en continuo, podría reducir la frecuencia de empleo de hemodiálisis. Una vez que el MIP se hubiera saturado con la sustancia no deseada, podría desecharse, reemplazado por otro nuevo. Podrían diseñarse también dispositivos impresos para eliminar sustancias no deseadas de otras partes del cuerpo, como el tracto gastrointestinal. Por ejemplo los moldes de moléculas de colesterol pueden extraer colesterol a partir de disoluciones.

La selectividad de los MIP podría ser aprovechada por la industria farmacéutica para la obtención de fármacos de mayor pureza. La pureza puede resultar especialmente importante cuando un fármaco presenta dos formas, imágenes especulares una de la otra, una de las cuales es beneficiosa y la otra potencialmente nociva. La talidomida es un ejemplo clásico. A finales de los años cincuentas y principios de los sesentas, antes de que alguien se percatara de que la forma útil tenía una imagen especular perjudicial, en docenas de países se prescribieron a numerosas mujeres, por diversas razones, fórmulas que contenían ambas formas. Trágicamente la forma “mala” de la molécula produjo graves malformaciones en 10,000 bebés de mujeres que tomaron el medicamento durante el embarazo.

Los fabricantes de medicamentos a menudo sintetizan por separado las dos imágenes especulares de una molécula, pero los métodos de producción pueden dar lugar a la formación de pequeñas cantidades de la forma molecular no deseada. Comparada con las técnicas comerciales habituales, las que se basan en los MIP podrían resultar más eficaces a la hora de eliminar la versión no deseada de un fármaco, ya que cada forma encajaría perfectamente sólo en una de las correspondientes cavidades.

Entre las sustancias potencialmente nocivas que han sido detectadas por los MIP se encuentra el herbicida atrazina.

Tanto el gobierno como la industria han mostrado un gran interés en unidades enmarcadas en esta línea para la limpieza ambiental de lagos, arroyos y suelos.

Mientras que muchas aplicaciones de los MIP se basan en su habilidad para capturar las moléculas o microorganismos que se ajusten a una plantilla concreta, otras aplicaciones implican el moldeado plástico que imita la totalidad de una parte de una molécula natural como, por ejemplo, un anticuerpo. Tales “plasticuerpos”, como se les denomina, podrían en potencia reemplazar a los anticuerpos naturales en muchas pruebas, con la siguiente reducción del empleo de animales⁵⁶.

3.6.2 Aplicación de los polímeros de impresión

En los últimos años el gran desarrollo de sistemas inteligentes con “imprinted” (Tabla 1.), ha recabado pruebas en el incremento de documentos para la aplicación de los MIPs en la designación de sistemas de liberación de fármacos y en los útiles mecanismos de diagnóstico y remoción de sustancias desde el cuerpo, a tal grado, que se han realizado

estudios de especificidad comparando estos con los anticuerpos monoclonales.

Un completo resumen acerca de los MIPs para esteroides y en particular el colesterol fue realizado por Davidson y Hayes ⁵⁷. Polímeros de impresión conteniendo ciclodextrinas demostraron tener una mayor capacidad para formar los complejos de inclusión con colesterol. Las ciclodextrinas son comúnmente utilizadas para precipitar colesterol desde disoluciones concentradas, teniendo el inconveniente de que el colesterol queda limitado por la reorganización dentro de la cavidad de la β -ciclodextrina, la unión efectiva entre dos o más ciclodextrinas incrementan la interacción con la molécula de colesterol. Komiyama et al. prepararon polímeros con dos grupos de ciclodextrinas con una adecuada distancia para el complejo entre la molécula del colesterol. El sistema MIPs-colesterol muestra una fuerte y selectiva unión sobre sustratos en medio acuoso, considerando después de varias síntesis que para lograr un mejor imprinted el colesterol tenía que ser adicionado antes de la etapa de polimerización y la utilización de monómeros anfifílicos, logrando así tener una gran capacidad de adsorción.

Otro ejemplo que se suma a esta lista es el polímero que prepararon Wizeman and Kofinas⁵⁸, teniendo un MIP no covalente por asociación iónica para la unión de glucosa en el estómago y en intestino, asegurando que la glucosa y la fructosa tienen diferente capacidad de unión. El MIP podría simplemente ser ingerido con los alimentos reduciendo los niveles de glucosa en sangre, además de que podría ser aplicado como sensor.

Tabla 1. Algunas empresas que utilizan los MIP

EMPRESA	ACTIVIDADES
Aspira Biosystems Burlingame, California	Emplea como plantilla un segmento seleccionado de proteína mediante una técnica denominada impresión molecular parcial; espera aplicar la aproximación en investigación y terapia médica.
MIP-Globe Zúrich, Suiza	Trabaja en la mayoría de aspectos de moldeado molecular, incluyendo aplicaciones relacionadas con el descubrimiento de fármacos.
MIP Solutions Las Vegas Nevada	Desarrolla técnica para contribuir al suministro de agua potable segura eliminando contaminantes y para usar en los tratamientos residuales y operaciones de explotación minera basada en agua.

MIP Technologies Lund Suecia	Diseña herramientas para la extracción y separación de sustancias a partir de mezclas complejas a escala analítica e industrial; la técnica esta pensada para las industrias farmacéuticas, química, alimentaria y otras industrias.
POLYIntell Rúan Francia	Diseña polímeros para su uso en purificación y detección; genera anticuerpos y enzimas artificiales a petición; para su uso en la industria farmacéutica y otras industrias.
Semorex North Brunswick, New Jersey y Ness Ziona, Israel	Desarrolla dispositivos manuales para ayudar a los médicos a diagnosticar enfermedades infecciosas y tumores en fase precoz o que permitan a militares y personal de seguridad y urgencias detectar e identificar rápidamente explosivos y armas químicas en el campo.

3.6.3 Mecanismos de preparación de los MIPs

Los principales mecanismos de preparación de los MIP se dividen en covalentes y no covalentes. En el primer caso, las uniones que se establecen entre el analito o la molécula molde y los monómeros funcionales son de carácter covalente. En cambio, en la ruta de síntesis no covalente las interacciones son del tipo puentes de hidrógeno, interacciones de Van der Waals y/o interacciones electrostáticas. A partir de estas uniones los monómeros funcionales se organizan en torno al analito, polimerizan y junto con las unidades de entrecruzamiento generan una red tridimensional. Por último, la molécula molde se extrae de esta matriz para dejar libre los puntos de reconocimiento mediante diversas técnicas (reacción de hidrólisis para la ruptura de enlaces covalentes o extracción con disolventes en la vía de preparación no covalente)⁵⁹.

3.6.4 Ventajas e inconvenientes de los MIPs como elementos de reconocimiento.

Como en todo lo nuevo, es necesario conocer las limitaciones de uso, tanto sus ventajas como sus inconvenientes.

A) Ventajas:

- i) Sensibilidad y selectividad elevadas.
- ii) Posibilidad de desarrollar MIPs destinados a muy diversos analitos incluyendo especies para las que aún no se ha encontrado un elemento de reconocimiento biológico.
- iii) Especificidad predecible teóricamente (la existencia de interacciones específicas.)

iv) Producción con un bajo costo a gran escala.

v) Tiempo de vida largo: estabilidad química, térmica y mecánicas altas.

B) Inconvenientes:

i) En general, las constantes de afinidad son bajas, es decir, que la afinidad del analito y del MIP a unirse es pequeña.

ii) Requiere altas concentraciones de molécula de molde para la formación del polímero de impresión.

iii) El procedimiento de síntesis de los MIPs conlleva a múltiples etapas y resulta laborioso. Además hay pérdidas de materia útil y se obtienen redes con una distribución poco homogénea de los puntos de unión.

iv) en algunos casos puede existir dificultad para operar en medios acuosos porque no se produce el reconocimiento del analito⁵⁶.

3.6.5 Síntesis de MIPs

Los procesos de síntesis pueden ser a través de los tres siguientes planteamientos:

1. El proceso no-covalente es el más utilizado por su relativa sencillez. La etapa de complejación durante la síntesis se logra por un mezclado de la molécula base con uno o más monómeros en un solvente favorable. Después de la síntesis la molécula base es removida del polímero resultante por una serie de lavados con un solvente o mezcla de solventes.
2. Las características anteriores ofrecen ventajas por encima del protocolo covalente. En donde las formaciones de uniones covalentes entre la molécula base y el monómero funcional es necesario una previa polimerización. Es más para la remoción de la molécula base es necesario partir en dos la unión covalente, entonces el polímero es sometido a una extracción a reflujo en un Soxhlet o someter el polímero con diferentes reactivos en solución.
3. El planteamiento semi-covalente es una hibridación de los dos métodos anteriores. Así la unión covalente se realiza entre la molécula base y el monómero funcional

antes de la polimerización, una vez que la molécula base es removida desde la matriz del polímero, la subsecuente unión del analito a el MIP implica interacciones no- covalentes.

3.6.6 Caracterización del polímero de impresión molecular

La caracterización de un polímero se dificulta en gran medida por la insolubilidad que presenta. Un grado de caracterización es posible: (1) la química, (2) la morfológica y (3) el comportamiento de reconocimiento molecular.

3.6.6.1 Química

Dada la naturaleza e insolubilidad del polímero de impresión, ocasiona la limitación de técnicas para su caracterización, descartando la NMR porque no es posible tener el polímero en solución. Entonces los métodos analíticos convenientes que pueden ser usados incluyen aquellos que puedan analizarse en su forma sólida.

3.6.6.1.1 Micro- análisis elemental

Este análisis puede ser utilizado de una manera rutinaria para medir el porcentaje por masa de carbono, hidrógeno, nitrógeno, cloro, etc. Esta técnica es aplicada al análisis de copolímeros, la información obtenida de la composición elemental puede ser frecuentemente utilizada para calcular la composición del monómero del polímero. Desafortunadamente el método no es capaz de detectar la cantidad de residuos en el polímero de impresión molecular.

3.6.6.1.2 Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR)

El espectro de FTIR de un polímero de impresión puede ser fácilmente elaborado y entonces de manera similar al estudio de micro-análisis elemental, se extrae información cualitativa sobre la composición del polímero. Además el FTIR permite realizar el estudio de interacciones no covalentes, aunque la sensibilidad de la técnica tiene una serie de limitaciones sobre la utilidad en esta última consideración.

3.6.6.2 Morfológica

Es posible evaluar la morfología de los polímeros de impresión. Dependiendo del método de análisis, la información puede proporcionar los volúmenes específicos de poro, tamaños de poro, distribución de poro y superficies específicas de área de los materiales. Dentro de los métodos analíticos se encuentran los siguientes:

3.6.6.2.1 Intrusión de solvente

Los macroporos del polímero son poros lisos permanentes en estado sólido y esto permite que el solvente tenga acceso a la red del poro. Por la medición de la cantidad de solvente

introducido en el polímero se puede estimar el volumen específico (mL/g).

3.6.6.2.2 Porosimetría por adsorción de nitrógeno

Este método involucra una cantidad fija de masa del polímero expuesta a un gas (usualmente nitrógeno) a una serie de presiones fijas. Por la cantidad de gas adsorbido a una presión dada, las isothermas de adsorción pueden ser construidas, seguida por la aplicación de la teoría de BET (Brunauer, Emmett y Teller) y modelos matemáticos. La información que se obtiene después de aplicar lo anterior es el área de superficie específica (m^2/g), volumen de poro específico (mL/g), diámetro promedio de poro, y distribución de tamaño de poro. El método es particularmente útil para analizar en detalle un tamaño de poro medio (meso-) y pequeño (micro). (La IUPAC define tamaño de poro de la siguiente manera: microporos $< 2 \text{ nm}$; mesoporos $2 \text{ nm} < \text{mesoporos} < 50 \text{ nm}$; macroporos $> 50 \text{ nm}$).

3.6.6.2.3 Porosimetría por intrusión de mercurio

Este análisis involucra fuerzas de unión de mercurio y presión baja, dentro de una masa fija de polímero seco. La información que puede ser generada desde tales experimentos es similar a la que se puede obtener por porosimetría de adsorción de nitrógeno, y este método es generalmente más sensible a poros macro.

3.6.6.2.4 Cromatografía de exclusión de tamaño inversa (ISEC)

En contraste a la porosimetría de adsorción de nitrógeno y mercurio, las cuales analizan el polímero en estado seco, ISEC permite el análisis de la estructura del poro del polímero en estado húmedo. La información sobre la estructura del poro del polímero en la fase estacionaria puede ser extraída aplicando posibles modelos matemáticos ya existentes. La técnica de ISEC es complementaria a las dos técnicas anteriormente mencionadas.

3.6.6.2.5 Microscopía

La microscopía puede ser utilizada en una variedad de distintas vías para sondear los polímeros de impresión sobre una variedad de escalas. Por ejemplo puede ser usado para ver la integridad estructural del polímero hasta tener una imagen de los macroporos⁶⁰.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Generar y caracterizar nanopartículas de ivermectina con la técnica de emulsificación-difusión como un sistema de liberación modificada y evaluar el encapsulamiento del fármaco liberado con un polímero de impresión.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Formar las nanocápsulas y caracterizarlas midiendo tamaño de partícula, potencial zeta, gradiente de densidad, morfología y estudios de liberación *in vitro*.
- Elaborar un polímero de impresión con ivermectina y realizar estudios de espectroscopia de infrarrojo y morfología para su caracterización.
- Estudiar la cinética y la eficacia del proceso de moldeo entre el polímero de impresión y el fármaco.
- Estudiar el efecto *in Vitro* del polímero de impresión sobre los escarabajos con heces tratadas con el sistema de liberación modificada.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Materiales y Equipos

Ivermectina, PISA (agropecuaria)

Aceite de ricino, SIGMA-ALDRICH

Agua desionizada

Acetato de etilo, Reactivo Analítico Baker®

PLA 40,000 (Lab. 213, Edificio E, Facultad de Química, UNAM.)

PLA 75,000-120,000, ALDRICH

Pluronic F- 127, SIGMA

TWEEN 20, Hycel de Méx. S.A. de C.V

SPAN 80, SIGMA

Sacarosa, SIGMA

ETDA, SIGMA-ALDRICH

TRIZMA ® BASE, SIGMA

MAA, SIGMA

EDGMA, SIGMA

AIBN, AKZO NOBEL

DMSO, Reactivo Analítico Baker®

Etanol, Reactivo Analítico Baker®

Ácido acético, Reactivo Analítico Baker®

Bicarbonato de Sodio

Baño de agitación

Balanza analítica, Explorer Ohaus

Celdas horizontales de Difusión de Franz con filtros de membrana Durapore® VVLP 0.1µm

Nanosizer Zen 3600

Parrillas de agitación magnética, Fisher scientific

Baño Ultrasónico, Cole-Parmer 8890

Espectrofotómetro UV-Visible, Ocean optics S-2000

DSC Shimadzu 50

Ultra turrax, T 18 Basic Disperser

Centrifuga JA 17 Beckman.

5.2 Metodología

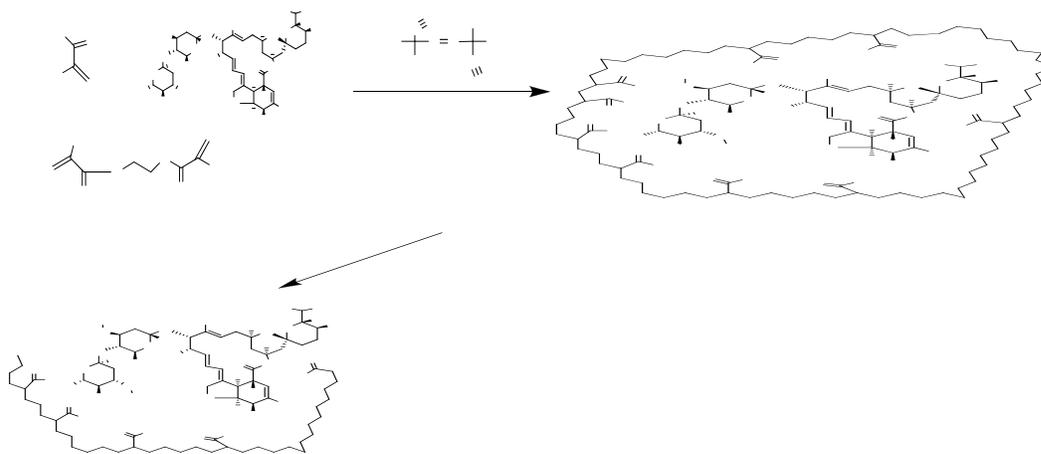
5.2.1 Polímero de impresión

Con la finalidad de lograr un polímero moldeado para la ivermectina se eligió MAA y EDGMA, mismo con el que ya existen estudios de desarrollo de polímeros estampados con buenos resultados⁶¹⁻⁶⁴.

5.2.1.1. Síntesis

Para llevar a cabo la síntesis del MIP se realizará mediante polimerización por radical libre, para ello se usan los siguientes reactivos. a) La plantilla, en este caso es la ivermectina que será la molécula molde para la elaboración del polímero de impresión. Debe tenerse en cuenta para la elección de la misma si la plantilla tiene grupos que puedan ser polimerizados, puedan inhibir o retardar la polimerización y que presente una estabilidad a temperaturas elevadas. b) Los monómeros para este polímero en particular es MAA que son los responsables de las interacciones entre los sitios de unión. Normalmente usados en exceso con respecto a la molécula molde en proporciones 1:4. Es muy importante la complementación entre los monómeros y la plantilla para la formación del complejo. c) El entrecruzador para este polímero fue EDGMA, tiene como funciones controlar la morfología de la matriz, estabilizar los sitios de unión e impartir estabilidad mecánica al polímero. d) El solvente en este caso DMSO se empleó para la realización del polímero el cual es responsable de mantener en disolución todos los componentes en la polimerización así como crear los poros (volumen de poros) originando que una buena elección del solvente puede arrojar que el polímero presente alta especificidad de área de superficie. e) El iniciador como ejemplo el AIBM que es el encargado de dar inicio a la polimerización.

REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN



Cabe mencionar que se realiza por duplicado la polimerización, en un caso en presencia del molde y en otro caso sin la molécula que fungirá como plantilla, a este lote se le considera el testigo.

Inicialmente se agrega 0.075g de AIBN en un tubo de ensaye, seguido por la adición de 155 μL de MAA, un volumen correspondiente de 1.76 mL de EDGMA y posteriormente la cantidad de 0.4g de ivermectina, y finalmente 4 mL de DMSO, se somete a una agitación para su disolución total de todos los componentes anteriormente mencionados. En seguida se efectúa un burbujeo con N_2 por cinco minutos (para la eliminación de los radicales libres), se colocan los tubos en un baño a una temperatura de 60°C por un lapso de 22 h para concluir la polimerización. Una vez terminado el tiempo de polimerización se somete a una molienda en un mortero de ágata y se determina el rendimiento obtenido. Lo que prosigue es el proceso de lavado, para ello se coloca en un vaso de precipitados todo el polímero obtenido y se adiciona el disolvente o mezcla de disolventes y se deja en agitación durante 20 hrs. Terminado este tiempo, se filtra por decantación para continuar el lavado con el siguiente disolvente o mezcla. La secuencia de lavados se expone a continuación: a) una mezcla de disolventes siendo el volumen total de 50 mL (etanol acético, 4:1), b) una mezcla de disolventes (etanol acético, 4:1), c) etanol, d) solución de bicarbonato de sodio (volumen 50 mL), e) solamente agua (1 h).

Estos disolventes han sido elegidos con el siguiente criterio: mezcla etanol-acético para modificar el pKa de la ivermectina, etanol porque es solvente que tiene mayor afinidad por la molécula que se empleó como plantilla evitando que este solvente ocasione solubilización en el polímero de impresión, la solución de bicarbonato se utilizó para eliminar los residuos del ácido acético y el agua para excluir residuos de los solventes antes mencionados.

Por 25 días más se continúa el lavado, cambiando diariamente el disolvente, en este caso solamente el lavado se efectuará con etanol.

5.2.1.2. Cinética de equilibrio del polímero de impresión-ivermectina

Con la finalidad de conocer aproximadamente el tiempo necesario para que el polímero de impresión incluya toda la ivermectina posible, se llevó a cabo un estudio cinético, el cual fue seguido mediante absorción UV-Vis usando un espectrofotómetro Ocean Optics, inc modelo DT 100.

La cinética de equilibrio se realizó a una temperatura de 25°C , en agitación, con una cantidad fija de polímero de impresión (20 mg) y una concentración constante de ivermectina ($2.28 \times 10^{-2} \text{ M}$), en intervalos de tiempo se tomaron las muestras, se filtró con filtro de jeringa de nylon ($0.45 \mu\text{m}$) y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 249.15 nm que corresponde al fármaco.

5.2.1.3. Estudio de eficacia del proceso de estampado

Este estudio se realizó a una temperatura de 25 °C, en agitación, con una cantidad fija de polímero de impresión (15 mg) y a diferentes concentraciones de ivermectina, se dejó interaccionando en un tiempo de 230 min, y posteriormente se filtró las muestras y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 249.15 nm, este procedimiento se efectuó para ambos polímeros el MIPs (polímero de impresión) y NIPs (polímero de impresión, sin el fármaco que fungió como plantilla).

5.2.1.4. Efecto del polímero de impresión sobre escarabajos

Teniendo en consideración la problemática ya mencionada en los antecedentes y los objetivos propuestos, se llevó a cabo un primer estudio *in Vitro* para conocer el efecto por si solo, o en presencia de la ivermectina del polímero de impresión sobre los escarabajos.

El estudio se efectuó en escarabajos de la especie *Aphodius constans*, siendo su origen de Topilejo, Morelos. Estos insectos fueron recolectados en frascos y tapados con gasas. Considerando que por cada 800g de heces de rumiante, la cantidad de insectos adultos es de 50. Después de conocer las condiciones necesarias de humedad (40%) y de temperatura (18 ± 2 °C) para la sobrevivencia de las larvas se prosiguió a efectuar la interacción del polímero con el escarabajo, realizando un esparcimiento del polvo (polímero libre de fármaco y con fármaco) en la superficie del terrario que estaba integrado por una mezcla de tierra (cuarzo de playa, vermiculita y de jardín, en las mismas proporciones) tratando de sumergirlo y que quedará mezclado con el excremento. De tal manera que el escarabajo adulto empuja y hace rodar una bola pequeña de estiércol, para alimentar y permitir el desarrollo de la larva en pupa hasta concluir en un imago. Se utilizaron tres cajas por grupo.

La cantidad de polímero expuesto a los escarabajos fue de 0.2887g, que es la necesaria para atrapar la concentración eliminada de ivermectina por el ganado vacuno, con un peso promedio de 300 Kg y considerando un tiempo de liberación del fármaco de 24 h.

Las dos muestras de polímero que estuvieron en contacto con el insecto, difieren en que una de ellas esta libre del piretroide, y el polímero que se encuentra con fármaco fue producto del estudio de la cinética, es decir, que el polímero libre estuvo en contacto con el principio activo durante los 230 min. Y posteriormente se eliminó el disolvente.

5.2.2. Nanocápsulas

Caracterización fisicoquímica de los componentes de la formulación

La elaboración de cualquier sistema requiere realizar pruebas previas para la selección de los componentes del sistema, un ejemplo es la solubilidad del fármaco en el aceite y en el disolvente orgánico. Este ensayo se realizó colocando una cantidad de fármaco en tubo de

ensaye, enseguida se adiciona un volumen de 100 μ L, se somete a agitación y se va agregando el mismo volumen hasta la solubilidad total del sólido.

5.2.2.1. Elaboración de las nanocápsulas

Existen varios modos de formar nanocápsulas, para este trabajo se enfocó en particular en el método emulsificación-difusión, para llevarlo a cabo es necesario el uso de dos solventes parcialmente miscibles entre si, como es el caso de acetato de etilo y agua, además la elección de este solvente orgánico tendría que permitir una solubilidad de otros componentes para la formación de las nanocápsulas como es el caso del aceite, polímero y fármaco. La fase acuosa estaría compuesta por la adición un tensoactivo o mezcla de tensoactivos, la elección del mismo sería de acuerdo al HLB requerido.

La primera metodología que se utilizó fue emulsificación-difusión, teniendo un volumen de fase acuosa de 5.5mL de agua y esta fue saturada en un 10% con acetato de etilo. La fase orgánica tuvo tres volúmenes 6, 8, 10 mL de acetato de etilo saturadas con un 3% de agua. En la fase orgánica se adiciona 0.5 mL de aceite de ricino, 180 mg de fármaco y porcentajes de 1, 2 3% de polímero PLA 40,000 g/mol con respecto al volumen de aceite adicionado. En el volumen de la fase acuosa se agregó 0.5mL de la mezcla de tensoactivos (55:45, Tween 20: Span 80), posteriormente se incorporan ambas fases, se somete a una agitación por 5 min. con un Ultra turrax T18 a una velocidad de 6,000 rpm. En seguida se incorpora un volumen de 40, 80, 120 mL de agua para provocar la difusión del solvente orgánico y permitir la formación de las nanocápsulas. Y finalmente la eliminación del solvente orgánico utilizando un rotavapor a una temperatura de 40°C. Con las proporciones anteriormente mencionadas de los componentes se realizaron una serie de combinaciones siendo un total de 30 formulaciones.

La segunda metodología que se empleó fue emulsificación-difusión. En la fase orgánica siendo un volumen de 20 mL de acetato de etilo se adicionó 0.35 mL de aceite de ricino, 60 mg de fármaco, 300 mg de polímero de PLA 40,000 Y 70,000-120,000. En volumen de 40 ml de agua se adicionó 1.5mL de la mezcla de tensoactivos o 0.96g de Pluronic F-127, después se adiciona esta última en la fase orgánica lentamente (gota a gota), se mantiene en agitación por 10 min, a una velocidad de 10,000 rpm con el ultra turrax T18. Posteriormente se adiciona un volumen de 100 mL de agua se agita por un minuto a una velocidad de 6000 rpm (ultra turrax) y se elimina el disolvente, a una temperatura de 55°C por un lapso de 15 min y posteriormente se mantiene en agitación por 20 min. a temperatura ambiente.

Además de la elaboración de las nanocápsulas se realizaron la formación de la nanoemulsión y nanoesferas, considerándose que las primeras carecen de polímero y las segundas de aceite.

La tercera metodología sólo se modifica la etapa de eliminación de solvente, después de la formación de la emulsión se elimina el solvente, es decir, no hay etapa de difusión.

5.2.2.2. Lavado de las nanocápsulas

Para la eliminación del tensoactivo el volumen total de la formulación se sometió a una velocidad de centrifugación de 16, 500 rpm (rotor JA 17) por un tiempo de una hora y media a 4 °C, posteriormente se separó el sobrenadante del botón y se adicionó un volumen de agua desionizada, se resuspendió la muestra y nuevamente se realizó otro tiempo de centrifugación.

5.2.2.3. Caracterización de las nanocápsulas

Es indispensable conocer las características de las nanocápsulas formadas, para ello se llevaron a cabo los siguientes estudios:

5.2.2.3.1. Tamaño de partícula

La distribución de tamaño de partícula se estudio por dispersión dinámica luminosa (DLS) utilizando el equipo Nanosizer Zen 3600 que utiliza un laser a 633 nm y un ángulo fijo de 173 °. La interacción entre las partículas y el haz luminoso hará que se disperse con un cambio pequeño de ángulo, esta difracción produce patrones de intensidad de la luz que son proporcionales al diámetro de la partícula que provoca la dispersión. Puede considerarse que el patrón de difracción producido por partículas de diámetros diferentes es la suma de todos los patrones individuales debidos a cada partícula en la distribución de tamaño.

Un ejemplo de la importancia de conocer el tamaño de partícula es una simple reproducibilidad que puede cambiar el perfil de liberación, así como el método de esterilización a seguir, su distribución en el organismo y su permanencia en la circulación por la destrucción o no por parte del sistema retículo endotelial.

5.2.2.3.2. Potencial Z

El potencial Z es una medida que se obtiene aplicando un campo eléctrico sobre una dispersión. Las partículas con carga dentro de esta dispersión migran hacia el electrodo con carga opuesta con una velocidad proporcional a la magnitud del potencial Z.

Esta velocidad es medida usando el efecto Doppler. La frecuencia en los cambios de la emisión de un láser causado por el movimiento de las partículas es medida como la movilidad de las partículas siendo posteriormente convertida al potencial Z por la aportación de la viscosidad del dispersante y la aplicación de la teoría de Smoluchowski.

La utilidad de esta medida es para conocer el comportamiento de la estabilidad coloidal, también es sabido que las partículas catiónicas son más tóxicas al organismo.

5.2.2.3.3. *Microscopía Electrónica de Transmisión*

Con la finalidad de conocer la morfología de las nanocápsulas formadas se llevaron a cabo estudios de microscopía electrónica de transmisión. En el microscopio electrónico de transmisión (MET o TEM) se irradia una muestra delgada con un haz de electrones de densidad de corriente uniforme, cuya energía está dentro del rango de 100 a 200 keV. La morfología de la partícula fue caracterizada usando TEM (JEM 2010, JOEL, Tokio, Japón). La preparación de la muestra se efectuó colocando en una rejilla de cobre recubierta de carbono una pequeña cantidad de partículas suspendidas, se deja que se elimine el medio en el cual se encuentran las partículas y posteriormente la imagen es capturada por una cámara.

5.2.2.3.4. *Gradiente de densidad*

En un tubo se adiciona sucesivamente 2 mL de la solución de sacarosa (3 a 33%) de manera que la más concentrada quede en el fondo del tubo y la de menor concentración en la parte superior, posteriormente se adiciona 1.5 mL de la muestra de las nanocápsulas en la superficie del gradiente, se centrifuga a 18,000g durante 3 hrs. a 4°C y se observa en dónde se encuentra el sistema para la identificación del mismo.

5.2.2.3.5 *Estudio de liberación” in Vitro”*

El estudio se efectuó en celdas horizontales de Difusión de Franz, integradas por un donador donde se adiciona un volumen conocido de la muestra (nanocápsulas, nanoesfera y fármaco) y un receptor donde se agrega el disolvente elegido (en este caso se realizó así, porque se pretende realizar un estudio de liberación acelerado) donde ambos compartimientos están separados por una membrana Durapore® 0.1µm.

La finalidad de hacer sistemas nanoparticulados, como ya se ha comentado anteriormente, es obtener un sistema de liberación lenta de ivermectina. No obstante, el llevar a cabo los estudios de liberación en modelos que simulen las condiciones in vivo es muy largo y costoso, por lo cual en este trabajo se ha optado por elegir un cambio de disolvente, no con la finalidad de simular comportamiento real, sino simplemente para hacer estudios comparativos entre los sistemas estudiados. Se eligió el acetonitrilo debido a la gran solubilidad de la ivermectina en el mismo, pero hay que tener en cuenta que la degradación del polímero, así como su misma solubilidad en este disolvente pueden llevar a diferentes mecanismos con respecto al medio habitual de elección (buffer fosfatos a pH 7.4)⁶⁵. Es posible que al cambiar la cinética de degradación del polímero haya importantes consecuencias sobre los patrones de liberación del activo, al disminuir el peso molecular de la matriz su movilidad aumenta y esto lleva a un incremento en la difusión del fármaco.

También la técnica de diálisis utilizando celdas de Franz ha sido seleccionada con respecto a otras técnicas como la conocida como “muestreo y separación” en base a la bibliografía⁶⁶.

⁶⁷

Ya montado el equipo, se mantiene a una temperatura constante de 37 °C y en agitación. En intervalos de una hora se toma el volumen total del receptor reponiendo posteriormente el volumen para asegurar condiciones sink, la toma de muestra se realiza por un lapso de 28 hrs.

Las muestras fueron cuantificadas por espectroscopia UV-VIS a una longitud de onda de 247 nm (máximo de absorbencia de la ivermectina) con el equipo Ocean Optics, inc modelo DT 100.

5.2.3 Estudio en ratones

El estudio se realizó en ratones ICR de 7 semanas de edad, por triplicado, se mantuvieron en una jaula metabólica para tener por separado la orina de las heces y durante una semana se recolectaron las heces para tener un control, posteriormente ya teniendo 8 semanas de edad y un peso promedio de 30.02g, se le administró por vía subcutánea la dosis de 0.180 mg/Kg correspondiente de un mes de la formulación que se eligió conteniendo al principio activo, transcurridas 24 h. se le administró por vía oral en forma de suspensión el polímero de impresión, en dosis de 2 mg/mL (cantidad fija) para cada uno de los ratones, diariamente por 5 días y se recolectaron las heces. Así también se administró solamente la formulación por la misma vía y dosis a los ratones para tener heces con ivermectina y realizar el estudio posteriormente con los escarabajos.

5.2.3.1 Efecto de la interacción polímero de impresión-ivermectina contenido en heces de ratones sobre los escarabajos.

Después de un tiempo de recolección de heces tratadas (formulación final y polímero de impresión que se les administró a los ratones) y considerando las mismas condiciones que se mencionaron anteriormente en el efecto del polímero de impresión sobre los escarabajos, en lugar de heces de ganado se les colocó 5g de las heces que se obtuvieron de los ratones tratados a los escarabajos.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Polímero de impresión

6.1.1. Evaluación del proceso de síntesis

Se observó que el tiempo de obtención del polímero es largo debido a los lavados sucesivos que deben ser realizados para eliminar el principio activo que fungió como plantilla, además se prestó atención de que la mejor técnica para reducir el tiempo de eliminación de residuos es por agitación y remoción del disolvente frente al uso del Soxhlet, ya que la diferencia entre ambas metodologías para eliminar los residuos del polímero de impresión es que el polímero que se encuentra contenido en el Soxhlet está en reflujo continuo siendo lento debido a que es gota por gota, en cambio el polímero que se encuentra en agitación y remoción del solvente permite que la interacción con el polímero sea eficiente y la eliminación de residuos sea más rápida.

El porcentaje de rendimiento que se obtuvo fue de 35.04% modificándose a un 72.02% cuando la elaboración del mismo se realiza a escala, probablemente se deba al método de separación, ya que al realizar el escalamiento del polímero de impresión se empleó vacío para acelerar la separación del solvente orgánico del sólido, diferenciándose de una separación por decantación.

El polímero de impresión obtenido debe ser caracterizado para asegurar su calidad y homogeneidad.

Una de las diferentes formas de caracterizar el polímero de impresión es observando su morfología (Fig. 4). Visualmente es un polvo fino de color blanco, que al ser observado al microscopio se muestra poroso.

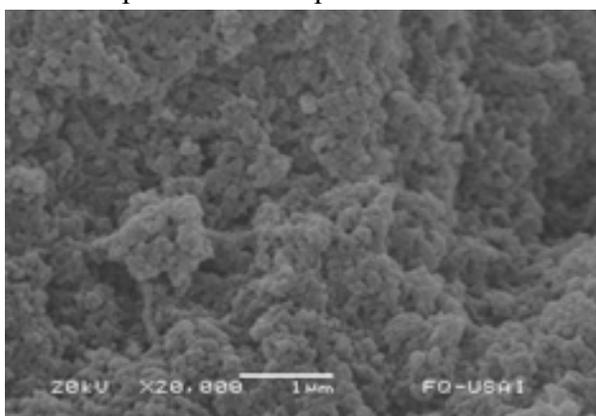


Fig. 4. Micrografía obtenida por SEM del polímero de impresión obtenido a partir de una relación molar MAA: EDGMA 4:20.

Espectroscopía de infrarrojo por transformadas de Fourier (Fig. 5) es otra técnica para caracterizar el polímero de impresión. Para este análisis se obtuvieron los espectros del polímero de impresión (en sólido) con fármaco que fungió como la plantilla, polímero lavado y el fármaco (ivermectina); observando las bandas correspondientes a los grupos funcionales característicos se percibe que el polímero de impresión lavado esta libre de fármaco ya que desaparecen las señales particulares de la ivermectina.

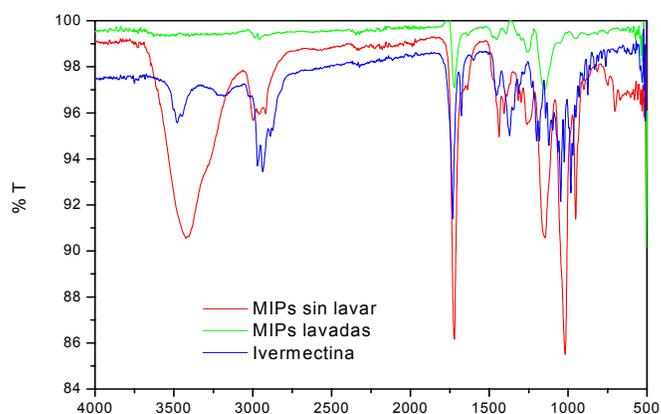


Fig. 5. Espectros de FTIR correspondientes al polímero de impresión con una relación molar MAA: EDGMA 4:20, polímero lavado e ivermectina.

6.1.2. Cinética de equilibrio del polímero de impresión

En la figura 6 se muestra la concentración de ivermectina frente al tiempo, en presencia del polímero estampado a temperatura constante de 37 °C.

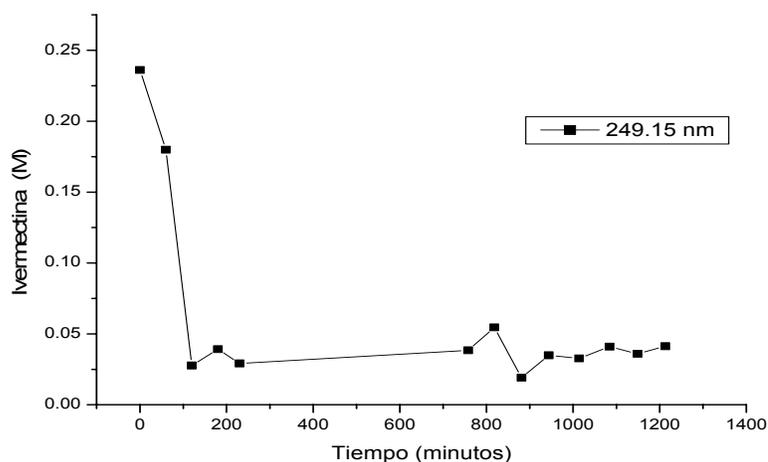


Fig. 6. Cinética de equilibrio del polímero de impresión

Este estudio de la cinética tiene como finalidad conocer el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, es decir, en cuanto tiempo el polímero estampado capta la mayor cantidad posible de ivermectina. Como puede observarse se alcanza la asíntota aproximadamente a los 200 minutos. Resultando que 0.693 mg de ivermectina es capturada por 20 mg de polímero, en un tiempo de 200 minutos.

6.1.3. Estudio de eficacia del proceso de estampado

En la figura 7 se puede observar el efecto del proceso de estampado sobre la captación de ivermectina.

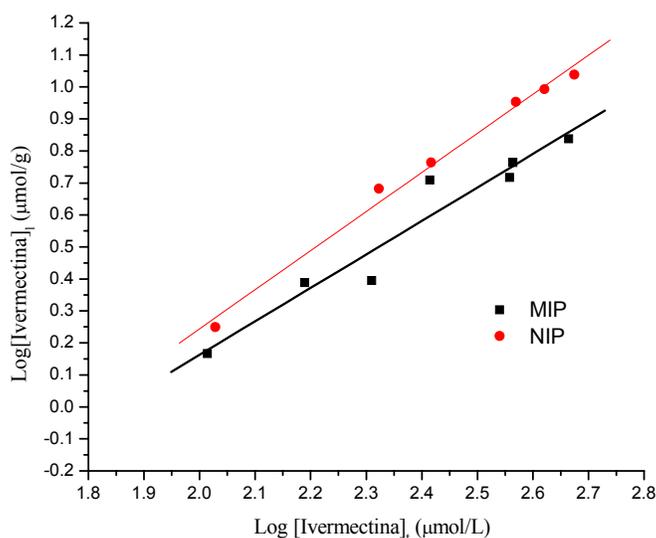


Fig.7. Isoterma de adsorción de ivermectina del MIP y NIP

El polímero blanco (NIP) obtenido sin la molécula que fungió como plantilla capta menor cantidad de fármaco que el que si fue moldeado (MIP), lo cual garantiza la eficacia deseada de la síntesis.

6.1.4. Efecto del polímero de impresión sobre escarabajos

Los estudios de ciertos medicamentos que se encuentran en las deyecciones de los animales han mostrado que éstos son tóxicos para los insectos coprófagos.

Hasta muy recientemente este impacto negativo era aceptado por los ganaderos o las firmas farmacéuticas, debido a la importancia económica de la producción comercial para controlar los parásitos del ganado. El valor de los tratamientos de rutina es discutida, considerando que una erosión silenciosa de la biodiversidad puede tener al final consecuencias sobre el funcionamiento de los pastizales, con la disminución de los componentes del ecosistema como son los coleópteros.

Al disponer del polímero de impresión y efectuar el estudio en el insecto, es decir, la ingesta del polímero se obtuvieron los siguientes resultados (Tabla 2):

Tabla 2 Resultados del efecto de los diferentes tratamientos en escarabajos adultos

GRUPO	DÍA 0	DÍA 2	DÍA 14	DÍA 30	DÍA 42
Polímero	50	50	49	48	43
Polímero	50	49	48	47	45
Polímero	50	50	49	47	39
Polímero + activo	50	50	0	0	0
Polímero + activo	50	50	0	0	0
Polímero + activo	50	50	0	0	0
Testigo	50	49	47	45	39
Testigo	50	50	48	48	45
Testigo	50	49	47	47	40
Ivermectina (IVOMECA®)	50	0	0	0	0
Ivermectina (IVOMECA®)	50	0	0	0	0
Ivermectina (IVOMECA®)	50	0	0	0	0

Tras llevar a cabo un tratamiento estadístico de los datos mostrados en la tabla 1 mediante análisis de varianza (ANOVA) y posterior prueba de Tukey (ver anexo I) se llegó a la siguiente discusión, en función del tiempo y del tratamiento..

Efecto del tiempo

A) Testigo

Al aplicar ANOVA en los valores de los grupos testigos se observa que hay diferencia significativa ($P < 0.05$), donde la prueba de Tukey arroja que a partir del día 42 el escarabajo se ve afectado simplemente por las condiciones usadas en el estudio.

B) Polímero de impresión sobre los escarabajos

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico (ANOVA), resultando que el efecto del polímero de impresión durante los 42 días de estudio difieren significativamente ($P < 0.05$), al utilizar la prueba de Tukey se observa que a partir del día 42 el polímero de impresión empieza a tener un efecto de mortandad en el insecto, pero al observar los resultados arrojados por los grupos testigos, podemos decir que no es por el polímero.

C) Ivermectina

El efecto del principio activo en los escarabajos es inmediato, ya que desde el segundo día no hubo sobrevivientes.

D) Polímero de impresión-ivermectina

La interacción del polímero de impresión e ivermectina manifiesta que durante el primer día y el segundo tienen el mismo efecto, y que los días 7, 14 y 30 son iguales entre ellos. Lo que indica que a partir del día 7 el polímero deja de tener el efecto de minimizar la muerte del coleóptero, probablemente este resultado está influenciado por el modo de realizar el estudio, es decir, el insecto está expuesto a que se alimente de una muestra concentrada, ya que el polímero de impresión-ivermectina queda esparcido en una pequeña área del terrario, por lo que una manera de comprobar lo anteriormente mencionado es realizar un estudio de campo.

Efecto del tratamiento

Los escarabajos fueron expuestos a tres formulaciones: ivermectina, polímero de impresión y la interacción del polímero de impresión-ivermectina. El análisis estadístico manifiesta que al hacer la comparación entre las formulaciones para el día 2 la ivermectina es la que difiere de las otras dos y del grupo testigo, lo que indica su toxicidad. Para el día 14 las formulaciones de ivermectina sola y con polímero de impresión estadísticamente no son significativamente diferentes, mientras que existe una diferencia significativa con el grupo testigo y el polímero. Siendo que en el grupo testigo tiende a presentar más mortandad que el grupo expuesto al polímero, manifiesta que la muerte del escarabajo está afectada por las condiciones de trabajo. En el caso del día 30 no hay diferencia significativa entre el grupo testigo y el polímero de impresión, mientras que la ivermectina y el polímero-ivermectina manifiestan diferencia significativa entre los dos grupos anteriormente mencionados, lo que señala que el polímero de impresión-ivermectina tiende a matar al escarabajo. El día 42 presenta el mismo comportamiento del día 30, siendo la discrepancia entre estos días que incrementa la muerte del insecto. Como ya se ha comentado anteriormente, es posible que esto se deba al hacinamiento de los escarabajos con el tratamiento en un pequeño espacio.

Es evidente que el polímero de impresión no resulta tóxico para el escarabajo, mientras que la ivermectina causa muerte rápida de todos ellos. Cuando el fármaco se encuentra interaccionando con el polímero se muestra una disminución de la toxicidad, aunque tras un período largo el coleóptero acaba por morir. Se asume que esta toxicidad se debe a la gran cantidad de ivermectina que se usó en el experimento que involucra ambas moléculas.

6.2. Caracterización fisicoquímica de los componentes de la formulación

6.2.1. Pruebas de solubilidad del fármaco (Ivermectina)

Se estudia con el fin de establecer su nivel de solubilidad en un sistema con un solvente o tal vez dos, para elegir los componentes y metodología más adecuada para la elaboración del sistema nanométricos.

Se obtuvo que la ivermectina presenta mejor solubilidad (tabla 3) en aceite de ricino que en los siguientes aceites: de almendras, olivo y mineral. Después de 22 hrs los tres últimos aceites, anteriormente mencionados, no alcanzaban la solubilidad total presentando una turbidez de mayor a menor intensidad en el siguiente orden: aceite mineral, aceite de olivo y aceite de almendras.

La selección del solvente orgánico (acetato de etilo) fue de acuerdo a la metodología, ya que la técnica que se seleccionó fue la de emulsificación- difusión, y para ello se requiere que el solvente a utilizar sea parcialmente miscible en el agua.

Tabla 3. Solubilidad de ivermectina en diferentes solventes.

Solvente	Solubilidad (mg/mL)
Agua	4.0 E-3
Aceite de ricino	14.28
Acetato de etilo	349.3

Se realizaron tres relaciones de aceite-acetato de etilo (2:1, 1:1, 0.5:1), donde el componente que se mantiene fijo es el acetato de etilo, resultando que la relación que contiene menor volumen de aceite es la que puede soportar mayor cantidad de fármaco (en 0.5 mL de aceite se puede incorporar 360 mg). Pero posteriormente al eliminar el solvente el fármaco tiende a precipitar, lo cual no es de extrañar, ya que la solubilidad en la mezcla es mayor que en el aceite solo. La cantidad de ivermectina que puede soportar el aceite evitando la precipitación del principio activo después de la eliminación del solvente es de 90 mg. Esto debido probablemente a que la presencia del acetato de etilo aumenta la velocidad de disolución del fármaco en el aceite.

6.2.2. Prueba de solubilidad del PLA

Otro factor a considerar en el sistema es la elección del polímero, que presenta como característica ser biodegradable y biocompatible. El polímero debe cumplir ciertos requisitos para ser utilizado en la formación de nanopartículas como ser insoluble en la mezcla. En la tabla 4 se muestran los datos de solubilidad obtenidos para el PLA.

Tabla 4. Solubilidad del polímero de PLA en acetato de etilo.

Polímero	Solubilidad
PLA (40,000 g/mol)	45.48 mg/mL
No es soluble en la mezcla de tensoactivos (Tween 20 y Span 80), ni en el aceite de ricino.	

Después de realizar estas pruebas de solubilidad del fármaco en diferentes solventes y que el polímero cumpliera con ciertos requisitos, los componentes que se eligieron para las formulaciones a realizar son: aceite de ricino, ácido poliláctico (40,000 g/mol), acetato de etilo, Tween 20 y Span 80 (50:50).

6.3. Diseño de las formulaciones

En base a los estudios anteriores y con la finalidad de obtener una formulación adecuada para nuestros propósitos, los cuales son obtener un sistema de tamaño nanométrico, reproducible, y de liberación modificada se llevaron a cabo una serie de estudios para ver el efecto de distintos parámetros en el sistema obtenido.

Tabla 5. Composición y parámetros analizados de las formulaciones realizadas.

Fármaco (F) 180 mg, Aceite de ricino (AR) 1 mL, Mezcla de tensoactivos (Ts, Span 80: Tween 20, 50:50) 0.5 mL, 5.5 ml de agua como fase externa. Tamaño de partícula (volumen), Potencial Zeta (PZ), cantidad de agua (mL) para la etapa de difusión, la cantidad de polímero es con respecto al volumen de aceite de ricino.

N	% P/P			mL			mL de agua			Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)
	polímero			solvente							
	3	2	1	10	8	6	120	80	40		
A	X					X			X	409.7	-28.1
B	X				X			X		406.6	-26.9
C	X			X			X			446.5	-27.7
D	X					X		X		486.1	-24.9
E	X					X	X			455.1	-22.2
F	X				X				X	563.2	-22.6
G	X				X		X			399.1	-29.8
H	X			X				X		478.9	-26.3
I	X			X				X		571	-23.6
J		X				X			X	397.1	-29.4
K		X			X			X		747.6	-25.4
L		X		X			X			710.3	-26.2
M		X				X		X		345	-24.0
N		X				X	X			345.3	-24.2
O		X			X				X	478.7	-19.6
P		X			X		X			391	-24.5
Q		X		X				X		470.8	-29.7
R		X		X					X	508	-23.2
S			X			X			X	1226	-28.6
T			X		X			X		434.8	-24.5
U			X	X			X			491.1	-24.5
V			X			X		X		473.3	-23.2
W			X			X	X			410.4	-25.6
X			X		X				X	357.4	-23.6
Y			X		X		X			703.5	-25.5
Z			X	X			X	X		455.1	-23.3
AA			X	X					X	328.4	-29.2

Como puede verse en la Tabla 5, las tres variables que se modifican son la cantidad de agua que esta involucrada en la etapa de difusión, la cantidad de solvente orgánico (acetato de etilo) y la cantidad de polímero (PLA, 40,0000).

Al aumentar la cantidad de polímero, manteniendo fijas las otras variables, se esperaría que el tamaño de las nanopartículas aumentase, simplemente por mayor volumen de uno de los componentes.

Al aumentar la cantidad de acetato de etilo, disolvente a difundir, el comportamiento esperado sería una disminución del tamaño. Esto debido a que a mayor cantidad de acetato de etilo, más tiempo será necesario para difundirlo y por lo tanto será más factible un acomodo del polímero ocupando el menor volumen posible, y consecuentemente dando tamaños inferiores de partícula.

Con respecto al agua de dilución usada, a mayor cantidad de agua adicionada menor tamaño, ya que se logrará un mayor proceso de difusión del acetato de etilo hacia el exterior y por ende un menor tamaño.

Viendo los valores de la tabla 3 se pueden hacer las siguientes observaciones:

Agua de difusión 40 ml: A las mayores cantidades de polímero y de acetato de etilo utilizadas, se observa el mayor tamaño de partícula, probablemente debido a que los 40ml de agua de difusión no alcanzaron a sacar todo el solvente orgánico de la fase interna. A medida que se disminuye la cantidad de acetato de etilo el tamaño disminuye y al bajar la cantidad de polímero también se tiende a un menor tamaño.

El caso extremo inferior, 1% de polímero y 6ml de disolvente orgánico muestra un tamaño muy grande en comparación al resto; se considera que la cantidad de polímero es demasiado pequeña para poder formar el sistema.

Agua de difusión 80 ml: A las mayores cantidades de polímero y de acetato de etilo utilizadas, se observa que el tamaño de partícula depende tanto de la cantidad de acetato de etilo que no ha difundido como del posible tiempo de reacomodo del polímero cuando la cantidad de disolvente orgánico es pequeña. A pequeñas cantidades de polímero se observa que el tamaño disminuye en función de la cantidad de acetato de etilo, reforzando la teoría del posible tiempo de reacomodo.

Agua de difusión 120 ml: A altas cantidades de polímero el comportamiento es similar al comentado con 80ml. Sin embargo al disminuir éste, se observa una tendencia contraria a lo esperado; lo anterior puede deberse a que experimentalmente se observó que a pesar de la gran cantidad de agua de difusión no se logró recuperar el 100% del disolvente orgánico.

Para poder entender perfectamente el comportamiento del tamaño vs las tres variables estudiadas sería necesario aumentar el número de puntos trabajados y mediante técnicas matemáticas de regresión de múltiples variables obtener una ecuación en que se ponderase mediante coeficientes el peso de cada una de las variables estudiadas. Esto mismo aplica para el estudio de potencial zeta.

El propósito de realizar las formulaciones anteriormente mencionadas fue para conocer el comportamiento del sistema y realizar una aproximación en las cantidades a utilizar. Sin embargo la caracterización de las muestras llevó a concluir que las cantidades utilizadas de cada componente no favorecían la formación del sistema deseado.

Se realizaron modificaciones en la cantidad de fase acuosa y fase orgánica, como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Composición de las formulaciones: Tween 20 y Span 80 (55:45), PLA 40,000 g/mol, aceite de ricino, fase orgánica (acetato de etilo)

Componentes	Formulación
Agua	40 mL
Tensoactivo	1.5 mL
Fase orgánica	20 mL
Fármaco	60 mg
Aceite	0.35 mL
Polímero	200 mg

La intención de esta nueva composición es saturar la fase interna de polímero, asegurando de esta manera que la mayor cantidad posible de fármaco se encuentre incorporada en las redes del polímero, además de asegurar que se tiene una emulsión aceite en agua.

En las formulaciones preliminares (tabla 5), se utilizaron cantidades menores de polímero, por lo que al modificar la cantidad de los otros componentes de la formulación se optó por ver si se lograba un sistema adecuado sin necesidad de aumentar en tal cantidad el compuesto polimérico. Lo que se observó se refleja en la tabla 7, donde se observa que el tamaño de partícula es proporcional a la cantidad de polímero, menor cantidad menor tamaño. No obstante, al trabajar con 20 mg se observa presencia visual de un precipitado en el fondo de la muestra, lo que quizá pudiera indicar que el sistema no se ha generado como se contemplaba en un inicio.

Tabla 7. Tamaño de partícula para los sistemas al variar la cantidad de polímero.

Cantidad de polímero	Tamaño (nm)
(20 mg)	617.9
(200 mg)	768.2

Posteriormente con la finalidad de disminuir la cantidad de tensoactivo, se llevo a cabo un estudio variando el volumen del mismo en el sistema (tabla 8).

Tabla 8. Tamaño de partícula del sistema variando el volumen de tensoactivo.

Volumen de Ts	Tamaño (nm)
0.5 mL	768.2
1.0 mL	645.4
1.5 mL	305.9

Los resultados que se muestran en la tabla 8 indican que a mayor cantidad de la mezcla de tensoactivos menor tamaño, lo cual es evidente en la formación de sistemas dispersos, ya que cabe la posibilidad de generar mayor área superficial y por lo tanto disminuir el tamaño.

Otra variable que fue considerada es el peso molecular del polímero. El sistema se estudió con PLA 75000-120000 g/mol (solubilidad en acetato de etilo 104.2 mg/ml; cumple las condiciones de no solubilidad en aceite de ricino ni en la mezcla de los tensoactivos), dando resultados similares a los ya comentados, tamaños grandes y falta de reproducibilidad.

Considerando todos los resultados anteriores, se concluye que la técnica empleada, aunada a la composición de la formulación, no lleva a resultados reproducibles. Por lo anterior, se optó por modificar el tensoactivo (Pluronic F-127) y controlar algunas de las variables que no se habían considerado anteriormente, tales como el tiempo de agitación, la velocidad de agitación en la etapa de difusión (1 min. a 6000 rpm), la velocidad de adición en la formación de la emulsión y el método para eliminar el solvente orgánico (calentamiento a 55°C y agitación).

Así, la composición de la formulación a estudiar se muestra en la tabla 9. Ésta mantiene la relación entre los diferentes componentes ya mencionada en la tabla 6.

Tabla 9. Composición de las formulaciones, tensoactivo Pluronic F- 127, PLA (75, 000-120,000 g/mol)

Componentes	Formulación
Agua	40 mL
Tensoactivo	0.96 g
Fase orgánica	20 mL
Fármaco	60 mg
Aceite	0.35 mL
Polímero	200 mg

En este estudio se observa que se obtiene un tamaño de partícula de 292.4 nm, el cual se repite en consecuentes estudios llevados a cabo (± 8.12), además de que no hay presencia evidente de precipitados en el fondo del recipiente.

Al lograr la reproducibilidad del sistema, se efectuó un estudio modificando la cantidad de polímero para conocer si existe una tendencia en el tamaño de partícula (tabla 10).

Tabla 10. Tamaño de partícula al modificar la cantidad de polímero.

Cantidad de polímero	Tamaño (nm)
200 mg	251.3
300 mg	262.6
400 mg	319.0

Se observa en la tabla 10 que el tamaño de partícula se incrementa a medida que aumenta la cantidad de polímero, aunque la diferencia no es tan marcada entre la nanopartículas originadas con 200 mg y 300 mg, por lo que se eligió la cantidad de 300 mg, pensando que al incrementar la relación de ivermectina/polímero podría observarse un comportamiento diferente en el porcentaje de encapsulamiento.

La formación de un sistema como éste puede llevar a la formación de nanocápsulas, nanoesferas o incluso una nanoemulsión. Entendiendo que la nanoesfera es una partícula que esta formada de una densa matriz polimérica, mientras que una nanoemulsión son gotas dispersadas en un intervalo de diámetro entre 100 y 500 nm.

Con la finalidad de poder asegurar que tipo de sistema ha sido generado en la última formulación, anteriormente mencionada, y como se indica en los antecedentes, se generan nanoesferas, nanocápsulas y nanoemulsiones para llevar a cabo un estudio comparativo, basado en gradiente de densidad. En los tres sistemas se mantuvieron constantes las cantidades de los componentes usados y todos los parámetros a controlar, siendo la diferencia entre ellas que las nanoesferas carecen de aceite de ricino y las nanomulsiones carecen del polímero, las nanocápsulas contienen el total de los ingredientes.

En la tabla 11 se muestran los datos de tamaño obtenidos para los tres sistemas elaborados.

Tabla 11. Talla de partícula de diferentes sistemas como nanocápsulas, nanoesferas y nanoemulsión

Sistema	Tamaño (nm)
NEsf	233.35
NE	269.55
NC	298.5

Recordando que se realizó una modificación en la utilización del tensoactivo y metodología, se evaluó el efecto de la cantidad de Pluronic F- 127. Para estas formulaciones se inició con una cantidad del 1% de tensoactivo observándose que el

tamaño era grande y que la distribución era bimodal, al incrementar al 2.4% se observa una sola distribución con un tamaño de 292.4 nm.

6.4 Caracterización de las nanocápsulas

La caracterización se realizó a los sistemas formados con las composiciones que se muestra en las tabla 12.

Tabla 12. Talla de partícula y potencial Z para el sistema de Pluronic F-127, PLA 75,000-120,000g/mol

Sistema	Tamaño (nm)	Potencial Z (mV)
NCs vacía	277.1	-28.1
NCs con ts	293.8	-20.3
NCss lavada	292.2	-31.2
NCs lavada (3° metodología)	304.0*	-37.2

*adición del volumen de agua de la etapa de difusión.

Con respecto al tamaño de partícula se observa (tabla 12) que tiende a disminuir cuando es eliminado la cantidad del tensoactivo después de realizar los lavados sucesivos al sistema, además de que el tamaño de la nanopartícula sin fármaco es menor que la nanopartícula con y sin tensoactivo. Estos resultados están ligados al potencial Z, para tener conocimiento de la posible estabilidad coloidal del sistema (tabla 12), donde la referencia de este valor es el sistema libre de fármaco y tensoactivo teniendo un potencial de -28.1 mV (la carga negativa de este valor se debe a la carga que puede proporcionar el ácido poliláctico de los grupos carboxilos que presenta el mismo), el valor del sistema que contiene el tensoactivo presenta un valor menor al de referencia, los sistemas sin tensoactivo (eliminación con los lavados) presentan un potencial Z muy parecido lo cual nos indicaría que la superficie de la partícula esta libre de fármaco. Es necesario modificar la carga de la superficie con la adición de un componente que proporcione una mejor estabilidad del sistema.

Morfología

La morfología de la nanocápsulas elaboradas con Pluronic F-127 y PLA (75,000-120,000) fue observada por TEM usando un JSM-(JEOL, Tokio), como ya se indicó en la metodología.

Se observa (fig.8) que la forma de la nanocápsula es esférica y además se presenta con diferentes densidades.

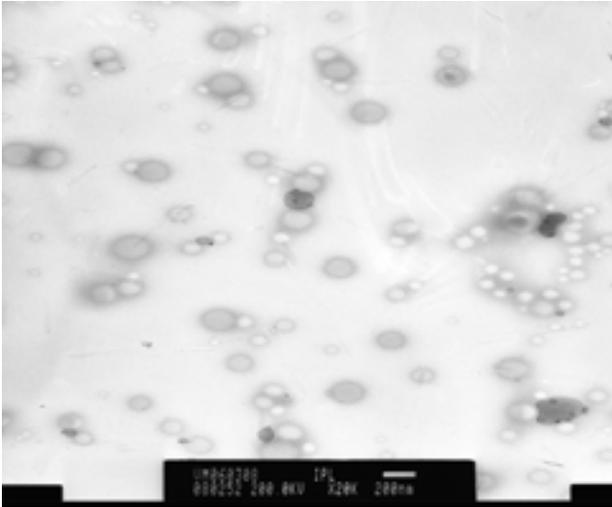


Fig.8. TEM micrografía de nanocápsulas de PLA (x20K), con Pluronic F- 127

Gradiente de densidad

Este estudio describe por gradiente de densidad de una serie de concentraciones de sacarosa (3 al 33%) la evidencia de diferentes sistemas que pueden ser originadas en la formación de las nanocápsulas como la nanoemulsión y/o nanoesferas.

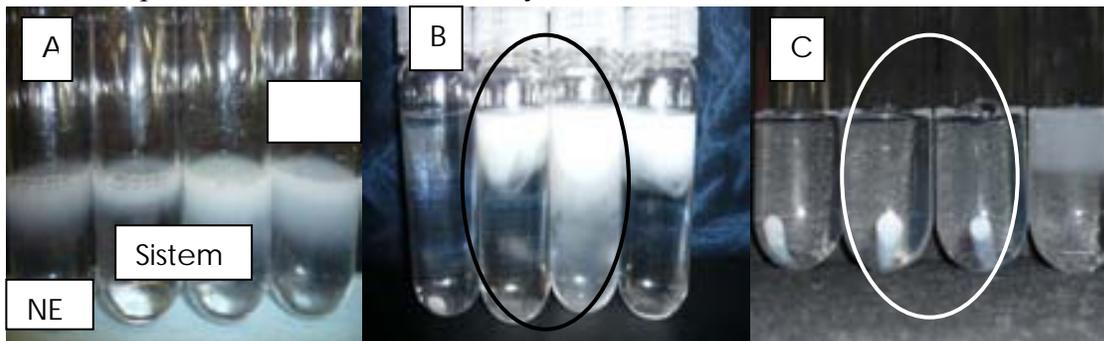


Fig. 9. Comparación de la densidad de las diferentes nanopartículas. A) los diferentes sistemas antes de ser sometidos a centrifugación. B) sistema obtenido de la composición de Tween 20:Span 80, PLA 40,000 g/mol. C) sistema obtenido con Pluronic F-127, PLA 75,000-120,000 g/mol.

Considerando que después de ser sometido el sistema a una velocidad de centrifugación en un tiempo dado, si existiera la formación de nanoesferas estas se observarían en el fondo del tubo, por el contrario si existiera la formación de una emulsión estas se verían en la superficie del tubo de centrifuga, tomando en cuenta estas observaciones la presencia de nanocápsulas estaría entre dichos sistemas.

Como se puede observar (fig.9B) el sistema formado por la mezcla de tensoactivo (Tween 20:Span 80, PLA 40,000 g/mol), después de ser sometido a una velocidad de centrifugación, indica que las partículas tienden a quedarse en la superficie del tubo de centrifuga resultando que el sistema que sea ha formado es una nanoemulsión (NE), es decir que la mezcla de tensoactivos, para el caso de la figura 9C el sistema que se formó

con Pluronic F-127 y PLA (75, 000-120,000g/mol) tiende a quedarse en el fondo como si se tratará de una nanoesfera (NEs), pero no podríamos asegurar con este estudio que realmente se tratará de una nanoesfera ya que en la literatura⁶⁸ se encontró que el sistema formado al encontrarse en el fondo del tubo de centrifuga fue catalogado como una nanocápsula, considerando que para este análisis la importancia recae en la relación polímero-aceite. Además de ser un análisis cualitativo, podemos observar que ambos sistemas presentan homogeneidad.

6.5. Estudios de liberación

El modelo de liberación de un fármaco desde un sistema es importante para entender y elucidar el mecanismo de transporte. Las expresiones matemáticas describen la cinética del principio activo, entre éstas se encuentran las ecuaciones de Higuchi y Peppas por mencionar algunas. La primera, Ec. (1), indica que la fracción de fármaco liberado es proporcional al cuadrado del tiempo. Donde k es una constante característica de la formulación, M_t y M_∞ son las cantidades acumulativas en un tiempo t y tiempo infinito. La segunda ecuación es semi-empírica (Ec. (2)) donde k es una constate cinética y n es el exponente característico del mecanismo difusional.

$$\text{Ec. 1.} \quad \frac{M_t}{M_\infty} = k * \sqrt{t}$$

$$\text{Ec. 2.} \quad \frac{M_t}{M_\infty} = k * t^n$$

A continuación, en la figura 10 se muestran los perfiles de liberación de la ivermectina sin formular y de los sistemas estudiados, nanoesferas y nanocápsulas (fabricadas con Pluronic F-127, PLA 75,000-120,000 g/mol).

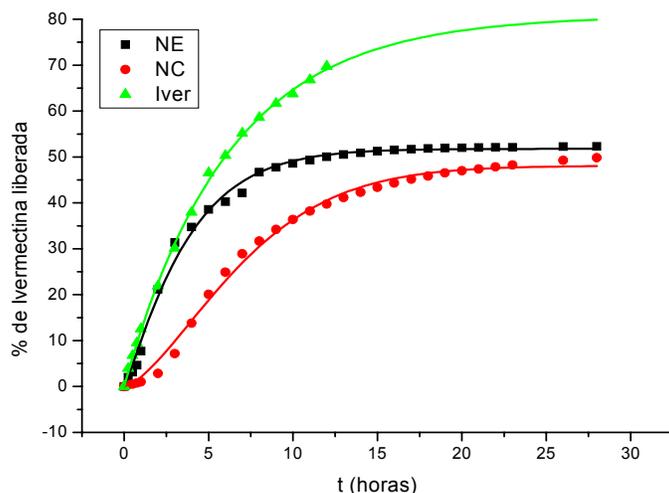


Fig.10.: Perfiles de liberación de nanoesferas (■), nanocápsulas (●) e ivermectina libre (▲). Los símbolos muestran datos experimentales, mientras que las líneas son los ajustes al modelo de Weibull.

Entre los muchos modelos que se informan en la bibliografía para poder discernir el mecanismo que rige el transporte del activo desde la formulación, algunos ya mencionados, se ha elegido el método empírico de Weibull (ecuación 3) dado que es el único que muestra la posibilidad de ajustar curvas tipo sigmoideo^{69, 70}, además de que su utilidad en simular liberación de activos desde sistemas de liberación prolongada fue reconocida en la conferencia de la AAPS/FIP del 2003⁷¹ La tabla 13 muestra los valores de los parámetros de la ecuación de Weibull para cada sistema.

Ec. 3:
$$Q = A * [1 - \exp(-\alpha * (t^b))]$$

Tabla 13: Valores obtenidos del ajuste a la ecuación de Weibull

	A	b	α (horas ⁻¹)	R ²
Ivermectina	80.83	0.993	0.1637	0.999
Nanoesferas	51.78	1.14	0.2152	0.993
Nanocápsulas	48.05	1.505	0.044	0.995

El exponente del tiempo “b” es un indicativo del mecanismo de transporte de un fármaco a través de la matriz, polimérica, en este caso. Cuando “b” es inferior a 0.75 indica una difusión tipo fickiana, mientras que si éste parámetro es superior a 0.75 e inferior a 1 indica un mecanismo combinado (difusión fickina y transporte caso II, hinchamiento). Si los valores son mayores de 1, el transporte del activo sigue un mecanismo complejo de liberación. En este caso la gráfica tiene forma sigmoidea, iniciando muy lentamente para posteriormente mostrar una velocidad muy rápida y terminar disminuyendo hacia una asíntota.

La “ α ” se considera como una constante de velocidad aparente⁷².

En base a los parámetros obtenidos puede concluirse que tanto la ivermectina formulada en las nanoesferas como la que se encuentra en las nanocápsulas es liberada mediante mecanismos complejos. Sin embargo la ivermectina libre muestra un valor de “b” que indica dependencia del gradiente de concentración.

Con respecto a “ α ” es evidente que el fármaco difunde más lentamente desde las nanocápsulas que desde las nanoesferas. El valor obtenido para el activo libre no puede ser comparado con los sistemas formulados debido a que su forma de la curva, o sea su mecanismo de liberación, difiere de los otros dos sistemas comparados.

Puede haber efecto debido al tamaño de partícula, ya que las nanoesferas son menores que las nanocápsulas y por lo tanto su área superficial de contacto con el medio es mayor.

Analizando las curvas por separado, se observa que la ivermectina sin formular muestra un comportamiento bilineal, con una pendiente hasta las 5 horas y otra menor hasta las 12 horas (tiempo al cual alcanza el 70% liberado), indicativa de una disminución en el proceso de difusión. El caso específico en que b es muy cercano a 1 asemeja un comportamiento cinético de primer orden, lo que indica que el gradiente de concentración en el medio de disolución conduce la velocidad de liberación. El caso de la Ivermectina podría ser un proceso controlado por difusión, aunado a un proceso gobernado por este. Además, de que la velocidad de disolución de la Ivermectina en acetonitrilo no es muy grande, así que puede ser que éste proceso juegue un papel en la cinética de liberación, junto con otros mecanismos de transporte.

Para las nanoesferas, se observa una liberación trifásica, iniciando con un efecto burst que dura aproximadamente tres horas y durante el cual se va liberando la ivermectina que estaba libre en el medio, según se comprueba por la similitud de los datos del sistema constituido solamente por ivermectina sin formular. Posteriormente se continúa con lo que se denomina en la bibliografía un efecto de inducción que en este caso dura hasta aproximadamente las 9 horas y que probablemente se deba a la desorción del activo desde la superficie de la nanopartícula para terminar con un período de velocidad muy lenta⁷³.

El efecto burst puede ser deseado en algunas ocasiones para lograr un efecto inicial de carga.

En el caso de las nanocápsulas es mucho más marcado el efecto sigmoideo. Existe un tiempo de liberación inicial muy lento, desde el tiempo cero hasta las 2 horas. Tiempo en el que probablemente ocurre la solvatación de la capa polimérica y hay un proceso de difusión inicial. Posteriormente el proceso de transporte incrementa, probablemente debido a un proceso de erosión, disolución y difusión. Estos procesos pueden ir cambiando las características de la capa polimérica y finalmente existe una disminución considerable de la liberación.

La presencia de todos estos mecanismos involucrados en la liberación del fármaco es concordante con los valores obtenidos para el parámetro “ b ”, que indica precisamente la complejidad del proceso de transporte.

6.6. Estudio en ratones

El objetivo de este estudio fue realizar la interacción del polímero con el fármaco en un organismo vivo, para evaluar la capacidad de encapsulamiento del polímero de impresión sobre la ivermectina liberada del sistema y posteriormente ver el efecto en los escarabajos.

Se observó que la administración del sistema no produjo la muerte del ratón, así mismo, pasado algunos días después de la administración de ambas formulaciones, es decir, la formulación del sistema de liberación conteniendo ivermectina y el polímero de impresión los ratones se mantuvieron en buen estado.

6.6.1 Efecto de la interacción polímero de impresión-ivermectina contenido en heces de ratones sobre los escarabajos

Al tener las heces de los animales tratados con la formulación de liberación modificada y las defecaciones que se obtuvieron después de la administración de ambos sistemas, se dieron las heces como alimento a los escarabajos. Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14 Resultados del efecto de los diferentes tratamientos en ratones sobre los escarabajos.

En heces de ratón	DÍA 0	DÍA 1	DÍA 5	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 30
Polímero	50	49	48	47	42	36
Polímero	50	49	47	43	40	39
Polímero	50	48	47	45	40	37
Polímero + activo	50	43	39	37	34	30
Polímero + activo	50	46	39	37	33	28
Polímero + activo	50	47	42	38	36	35
Testigo	50	50	47	45	44	42
Testigo	50	50	48	46	43	39
Testigo	50	49	47	47	44	40
Activo	50	19	8	0	0	0
Activo	50	21	14	0	0	0
Activo	50	16	6	0	0	0

Al analizar estadísticamente la tabla 14 mediante análisis de varianza (ANOVA) y posterior prueba de Tukey (ver anexo I) se llegó a la siguiente discusión en función del tiempo y del tratamiento.

Efecto del tiempo

A) Testigo

Al usar ANOVA en los valores de los grupos testigos se observa que hay diferencia significativa ($P < 0.05$), donde la prueba de Tukey arroja que a partir del día 7 el escarabajo se ve afectado, como ya se había observado en el estudio con heces de rumiantes.

B) Polímero de impresión

Entre los grupos que se les administró el polímero de impresión hay una diferencia significativa ($P < 0.05$), al realizar la comparación entre los grupos empleando la prueba de

Turkey, se obtiene que a partir del día 14 el polímero de impresión afecta al escarabajo, pero con lo obtenido en el grupo testigo nuevamente podemos decir que el polímero de impresión no es tóxico para el insecto.

C) Ivermectina

El efecto de la ivermectina se ve reflejado desde el día 1 y difiere del día 5 y 7, observando que existe un incremento del tiempo de sobrevivencia del coleóptero al administrar el sistema nanométrico formulado en comparación con el producto comercial (IVOMECA®). Lo cual probablemente está indicando que la dosis a la cual se ve sometido el escarabajo es inferior.

D) Polímero de impresión-ivermectina

Al realizar el análisis estadístico se presenta diferencia significativa, además se observa que hay más tiempo de sobrevivencia del escarabajo en comparación con el polímero que fue esparcido en las heces de rumiantes. Después de 30 días hay presencia de escarabajos, por lo que el polímero de impresión encapsula el fármaco que es liberado del sistema nanométrico y minimiza la muerte del insecto.

Efecto del tratamiento

Al día 1 todos los grupos se comportan de manera similar, a excepción del grupo tratado con ivermectina que muestra mortandad en los escarabajos, dando una diferencia estadísticamente significativa con los otros tres grupos.

En el día 5 no hay diferencia entre el grupo testigo y el grupo con polímero de impresión, pero ambos difieren con los grupos de ivermectina y polímero-ivermectina, lo cual indica que el polímero ya no está siendo tan eficaz, aunque los resultados muestran diferencia estadísticamente significativa entre el efecto del fármaco libre o en el interior del polímero.

Para el día 7 y el 14 tiene el mismo comportamiento del día 5.

Para el día 30 no hay diferencia de comportamiento con los primeros días. Sin embargo, se difiere en el número de escarabajos muertos.

Al diferir en los días del estudio entre el efecto de polímero de impresión por esparcimiento y en las heces de ratón con las diferentes formulaciones, no podemos hacer una comparación entre días, pero en el caso del día 30, día en donde ambos estudios se realizaron, se observa que presentan una similitud en cuanto al comportamiento de las formulaciones en los escarabajos, es decir, que el polímero de impresión no es el causante de la muerte del insecto. También se puede concluir, en general, que la encapsulación de la ivermectina en el polímero de impresión disminuye su toxicidad hacia estos coleópteros.

Este estudio nos indica que efectivamente la Ivermectina liberada por heces en los ratones tratados con polímero de impresión consigue ser, al menos en parte, encapsulada en el interior de los mismos.

VII. CONCLUSIONES

En la elaboración del polímero de impresión, el método que permite una mayor eliminación de residuos en menor tiempo es por agitación y remoción del solvente, con un 72.02% de rendimiento.

La caracterización del polímero de impresión (SEM y FTIR) manifestó que éste se encuentra libre del fármaco.

La cinética del polímero de impresión y principio activo proyectó que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es de aproximadamente 200 min.

El polímero blanco obtenido sin la molécula que fungió como plantilla capta menor cantidad de fármaco que el que contenía la molécula molde, lo cual garantiza la eficacia deseada de la síntesis.

El polímero de impresión no fue tóxico para el escarabajo, mientras que la ivermectina causa muerte rápida de todos ellos. Cuando el fármaco se encuentra interaccionando con el polímero se muestra una disminución de la toxicidad.

Se obtuvo un sistema con un tamaño de partícula de 292.4 nm y con un valor de carga superficial de -31.2mV.

El estudio de gradiente de densidad y TEM manifiestan que el sistema que se elaboró con la mezcla de Tween 20: Span 80 y PLA 40,000 g/mol es una nanoemulsión y que el sistema que se originó con Pluronic F-127 y PLA 75,000-120,000 g/mol son nanocápsulas.

El estudio de liberación indica que se logra una liberación más lenta cuando la ivermectina está incluida en nanoacarreadores, además de que nanoesferas y nanocápsulas muestran perfiles de liberación diferentes.

El efecto de la interacción polímero de impresión- ivermectina contenido en heces de ratones sobre los escarabajos manifiesta que los coleópteros presentan un tiempo de sobrevivencia mayor que cuando es expuesto al fármaco.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. //senasicaw.senasica.sagarpa.gob.mx, P. w.
2. Redondo, M. et al. Integrated control of acaricide-resistant *B. microplus* population on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac and amidine treatments. *Experimental and Applied Acarology* 23, 841-848 (1999).
3. Parra, M. H. et al. Manejo integrado de garrapatas en bovinos. Serie modular para la capacitación en tecnologías agropecuarias 2, 72-77. (1999).
4. //produccionbovina.com, P. w.
5. Cardozo, H. & Franchi, M. in *Enfermedades Parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención* (eds. Nari, A. & Fiel, C.) 369 – 402. (Editorial Hemisferio Sur, 1995).
6. Alfonso Guerra, A., Valdés Rodríguez, M., Méndez Mellor, L. & Quintana Torrente, Y. in *Congreso Biotecnología* (Habana,, 2005).
7. Rivera, M. *Hemoparasitosis Bovinas* (ANAUCO EDICIONES, C.A., Caracas, Venezuela., 1996).
8. Encinas, A., Oleada, A. & Pérez, R. in *Parasitología Veterinaria* (eds. Cordero del Campillo, M. & Rojo Vázquez, F. A.) 420-429 (Mc Graw-Hill-Interamericana, Madrid, 1999).
9. Bianchin, I., Honer, M. R., Gomes, A. & Koller, W. W. Efeito de alguns arrapaticidas/ insecticidas sobre *Onthophagus gazella*. *EMBRAPA Comunicado Técnico* 45, 1-7 (1992).
10. Bianchin, I., R.G.O., A. & W.W., K. Effect of pour-on tickicides/insecticides on adults of the African dung beetle *Onthophagus gazella* Fabr. (Coleoptera: Scarabaeidae). *An. Soc. Entomol. Bras.* 27, 275-279 (1998).
11. Wardhaugh, K. G., Longstaff , B. & Lacey, M. J. Effects of residues of deltamethrin in cattle faeces on the development and survival of three species of dung-breeding insects. . *Aust. Vet. J.* 76, 273-280 (1998).
12. Ortiz, M. & Franco, B. R. in *Congreso Biotecnología* (Habana, 2005).
13. Rodríguez, D. (Facultad de Medicina Veterinaria,, UNAH, Cuba, 2002).
14. Dwight, D., Bowman, R. C. L., Eberhard, M. L. & Georgi, J. R. *Parasitología Veterinaria* (Elsevier, España).
15. Shoop, W. L., Mrozik, H. & Fisher, M. H. Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. *Vet. Parasit.* 59, 139-156 (1995).
16. Rojas-Martínez, J. L. & Castro, A. Algunas consideraciones generales sobre las Ivermectinas. Sección de Toxicología, Dirección de salud Animal, MAG (2004).
17. Herd, R. P., B.R., S. & F.F., P. Dung dispersal and grazing area following treatment of horses with a single dose of ivermectin. *Vet. Parasit.* 48, 229-240 (1993).
18. //cnia.inta.gov.ar, P. w.
19. Cramer, L. G., Carvalho, L. A. F., Bridi, A. A., Amaral, N. K. & Barrick, R. A. Efficacy of Topically Applied Ivermectin against *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) in Cattle. . *Veterinary Parasitology*, 29, 341-349 (1998).

20. Davey, R. B., Allen Miller, J., George, J. E. & Miller, R. J. Therapeutic and persistent efficacy of a single injection treatment of ivermectin and moxidectin against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on infested cattle. *Experimental and Applied Acarology* 35, 117–129 (2005).
21. Rand, K. N. et al. Cloning and expression of a protective antigen from cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc. Nac. Acad.* 86, 9657-9661 (1989).
22. Willansed, P. & Kemp, D. Vaccination with “Concealed” antigens for tick control. *Parasitology Today*. 4, 199 (1988).
23. Rodríguez, M. Respuesta inmunológica contra garrapatas. *Biotecnología aplicada*. 17, 215-220. (2000).
24. Valdés, M. et al. in Congreso Biotecnología (Habana, 2005).
25. Vargas, M. et al. in Congreso Biotecnología (Habana, 2005).
26. Betancourt, A., Patiñot, F., Torres, O. & Eugenio, B. Prueba de estado para evaluar la efectividad de Tickvac MK contra la garrapata *Boophilus microplus*. *ACOVEZ, Informe Especial*, 18-25. (2004).
27. Peconick, A. P. et al. Synthetic vaccine (SBm7462) against the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: Preservation of immunogenic determinants in different strains from South America. . *Experimental Parasitology* 119, 37-43 (2008).
28. Nascimento-Silva, M. C. L. et al. BYC, an atypical aspartic endopeptidase from *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* eggs. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 149, 599–607 (2008).
29. Canales, M. et al. Expression of recombinant *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, *R. annulatus* and *R. decoloratus* Bm86 orthologs as secreted proteins in *Pichia pastoris*. *BMC Biotechnology* 8, 14 (2008).
30. de Moura Souza, R. et al. in Congreso Biotecnología (Habana, 2005).
31. Polanco, H. C. in Ciencias en Medicina Preventiva (Universidad Agraria de la Habana, Habana, Cuba, 2001).
32. Alonso -Díaz, M. A., I., R. V. R., H., F. S. & R., R. C. Ixodicide resistance of the the *Boophilus microplus* tick to ixodicides. *Arch. Med. Vet.* 38, 105-113 (2006).
33. Armendáriz, G. I. Report of a case of multiple resistance to ixodicides on *Boophilus microplus* *Canestrini* (Acari: Ixodidae) in Tamaulipas, México. *Vet. Méx.* 34, 397-401 (2003).
34. Villarroel, A. M. Prevalence and potential risk factors for pyrethroids resistance in *Boophilus microplus* ticks on milk farms in Santa Cruz Department, Bolivia. *Téc Pecu Méx.* 44, 155-167 (2006).
35. Rimbaud, E. Las garrapatas en el vacuno. *Revista enlace. Centro de Estudios, Diagnóstico e Investigación Veterinarias de la Facultad de Ciencias Agrarias de la UCC. Managua.*
36. //nanotecnologianoticias.es/, P. w.
37. Winzenburga, G., Schmidt, C., Fuchs, S. & Kissel, T. Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 1453– 1466 (2004).

38. Soil, M. D., G.W., B., I.H., C. & S.J., G. Efficacy of ivermectin delivered from an intraruminal sustained-release bolus against natural infestations of five African tick species on cattle. *Veterinary Parasitology*, 37, 285-296 (1990).
39. Miller, J. A., Davey, R. B. & Oehler, D. D. in Proc. Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 1166– 1167 (Boston, 1999).
40. Miller, J. A., Oehler, D. D. & Pound, J. Delivery of ivermectina by injectable microspheres. *J. Econ. Entomol.* 91, 655– 659 (1998).
41. Miller, J. A. et al. Control of *Boophilus annulatus* (Say) (Acari; Ixodidae) on cattle using injectable microspheres containing ivermectin, . *J. Econ. Entomol.* 92, 1142– 1146. (1999).
42. Couver, P., Barratt, G., Fattal, E., Legrand, P. & Vauthier, C. Drug Carrier Systems. *Critical Reviews in therapeutic.* 19, 99-134 (2002).
43. Legrand, P., G., B., V., M., Fessi, H. & Devissaguet, J. P. Polymeric nanocápsules as drug delivery systems. A review. *S.T.P. Pharma Sciences* 9, 391-396 (1999).
44. Chavez, F. Liberación de sustancias lipófilicas a partir de nanocápsulas poliméricas. *Rev.Soc.Quím.Méx.* 46 (2002).
45. Gallardo, M. et al. Study of the mechanisms of formation of nanoparticles and nanocapsules of polyisobutyl-2-cyanoacrylate. *International Journal of Pharmaceutics* 100, 55-64 (1993).
46. Mosqueira, V. C. F., Legrand, P., Pinto-Alphandary, H., Puisieux, F. & Barratt, G. Poly(D-Lactide) Nanocapsules Prepared by a solvent Displacement Process: Influence of the Composition on Physicochemical and Structural Properties. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89, 614-626 (2000).
47. Abdelwahed, W., Degobert, G. & Fessi, H. A pilot study freeze drying of poly (epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl alcohol): Formulation and process optimization. *International Journal of Pharmaceutics* 309, 178-188 (2006).
48. Colombo, A. P., Briancon, S., Lieto, J. & Fessi, H. Project, Design, and Use of a pilot plant for Nanocapsule Production. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 27, 1063-1072 (2001).
49. Guinebreière, S., Briancon, S., Lieto, J., Mayer, C. & Fessi, H. Study of the Emulsion-Diffusion of Solvent: Preparation and characterization of nanocapsules. *Drug. Development Research* 57, 18-33 (2002).
50. Guinebreière, S., Brianon, S., Fessi, H., Teodorescu, V. S. & Blanchin, M. G. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy. *Materials Science and Engineering C21*, 137-142 (2002).
51. Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allémann, E. & Doelker, E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics* 143, 133-141 (1996).
52. Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allémann, E. & Doelker, E. Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. *International Journal of Pharmaceutics* 188, 155-164 (1999).

53. Quintanar-Guerrero, D., Fessi, H., Allémann, E. & Doelker, E. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification- diffusion technique. *Pharm. Res* 15, 1056-1062 (1998).
54. Iglesias, L. E. et al. Impacto ambiental de la ivermectina eliminada por bovinos tratados en otoño, sobre la coprofauna y la degradación de la materia fecal en pasturas (Tandil, Argentina). *RIA* 34, 83-103 (2005).
55. Behling Miranda, C. H. in X Seminario de Pastos y Forrajes (2006).
56. Mosbach, K. Perspectivas del moldeado molecular. *Investigación y ciencia*, 363, 68-73 (2006).
57. Davidson, L. & Hayes, W. Molecular imprinting of biologically active steroidal systems. *Current Organic Chemistry* 6, 265-281 (2002).
58. Wizeman, W. J. & Kofinas, P. Molecularly imprinted polymer hydrogels displaying isomerically resolved glucose binding. *Biomaterials* 22, 1485-1491 (2001).
59. Caro, E., Marcé, R. M., Borrull, F., Cormack, P. A. G. & Sherrington, D. C. Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples. *Trends in Analytical Chemistry* 25, 143-154 (2006).
60. Cormack, P. A. G. & Elorza, A. Z. Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 804, 173-182 (2004).
61. Jungang, G., Zhanli, L., Pengyan, L. & Ning, J. Preparation of MAA/TRIM molecularly imprinted polymers and binding selectivity for ciprofloxacin. *Chemical Journal on Internet* 9 (2007).
62. Puoci, F. et al. Molecularly imprinted solid phase extraction for the selective HPLC determination of α -tocopherol in bay leaves. *Analytica Chimica Acta* 593, 164-170 (2007).
63. Shi, X., Wu, A., Qu, G., Li, R. & Zhang, D. Development and characterisation of molecularly imprinted polymers based on methacrylic acid for selective recognition of drugs. *Biomaterials* 28, 3741-3749 (2007).
64. Syu, M.-J. et al. Ionic effect on the binding of bilirubin to the imprinted poly(methacrylic acid-co-ethylene glycol dimethylacrylate). *Journal of Chromatography A*, 1122, 54-62 (2006).
65. Makino, K., Arakawa, M. & Kondo, T. Preparation and in vitro degradation properties of polylactide microcapsules. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 33, 1195-1201 (1985).
66. D'Souza, S. S. & DeLuca, P. P. Development of a dialysis in vitro release method for biodegradable microspheres. *AAPS PharmSciTech* [electronic resource]. 6 (2005).
67. D'Souza, S. S. & DeLuca, P. P. Methods to assess in Vitro drug release from injectable polymeric particulate systems. *Pharmaceutical Research* 23, 460-474 (2006).
68. Olvera-Martínez, B., Cázares-Delgadillo, J., Calderilla-Fajado, B. & Ganem-Quintanar, A. Preparation of Polymeric Nanoapsules Containing Octyl Methoxycinnamate by the Emulsification-Diffusion Tecnique: Penetration

- Across the Stratum Corneum. *Journal of pharmaceutical Sciences* 94, 1552-1559 (2005).
69. Kervinen, L. & Yliruusi, J. Modelling S-shaped dissolution curves. *International Journal of Pharmaceutics* 92, 115-122 (1993).
 70. Langenbucher, F. Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 24, 979-981 (1972).
 71. Siewert, M. et al. FIP/AAPS Guidelines to dissolution/in vitro release testing of novel/special dosage forms. *AAPS PharmSciTech* 4 (2003).
 72. D'Souza, S. S., Faraj, J. A. & DeLuca, P. P. A Model-dependent Approach to Correlate Release From Biodegradable Microspheres. *AAPS PharmSciTech* 6, E553-E564 (2005).
 73. Budhian, A., Siegel, S. J. & Winey, K. H. Controlling the in vitro release profiles for a system of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics* 346, 151-159 (2008).

ANEXO I

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Testigo_A	3	50	0	0
Testigo_B	3	49,33333	0,57735	0,33333
Testigo_C	3	47,33333	0,57735	0,33333
Testigo_D	3	46,66667	1,52753	0,88192
Testigo_E	3	41,33333	3,21455	1,85592

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal
 Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	4	140,266667	35,0666667	13,15000	0,00054
Error	10	26,6666667	2,66666667		

At the 0,05 level,
 the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals	Significant at 0,05
			Lower Limit Upper Limit	Level
Testigo_A	50			
Testigo_B	49,33333	0,66667	-3,72144 5,05478	No
Testigo_C	47,33333	2,66667	-1,72144 7,05478	No
Testigo_D	46,66667	3,33333	-1,05478 7,72144	No
Testigo_E	41,33333	8,66667	4,27856 13,05478	Yes
Testigo_B	49,33333			
Testigo_C	47,33333	2	-2,38811 6,38811	No
Testigo_D	46,66667	2,66667	-1,72144 7,05478	No
Testigo_E	41,33333	8	3,61189 12,38811	Yes
Testigo_C	47,33333			
Testigo_D	46,66667	0,66667	-3,72144 5,05478	No
Testigo_E	41,33333	6	1,61189 10,38811	Yes
Testigo_D	46,66667			
Testigo_E	41,33333	5,33333	0,94522 9,72144	Yes

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Ivermectina_A	3	50	0	0
Ivermectina_B	3	0	0	0
Ivermectina_C	3	0	0	0
Ivermectina_D	3	0	0	0
Ivermectina_E	3	0	0	0

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
--------	-----	----------------	-------------	---------	---------

Análisis de varianza de un factor

Polímero

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	3	150	50	0
Fila 2	3	149	49.66666667	0.33333333
Fila 3	3	146	48.66666667	0.33333333
Fila 4	3	142	47.33333333	0.33333333
Fila 5	3	127	42.33333333	9.33333333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	116.93	4	29.23333333	14.1451613	0.00040118	3.47804969
Dentro de los grupos	20.667	10	2.06666667			
Total	137.6	14				

Ho: En los cinco días el comportamiento de los escarabajos ante el polímero es igual

Ha: En los cinco días el comportamiento de los escarabajos ante el polímero es igual

F es mayor que F_c , por lo cual se rechaza la hipótesis nula ($P < 0.05$)

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Data1_A	3	50	0	0
Data1_B	3	49,66667	0,57735	0,33333
Data1_C	3	48,66667	0,57735	0,33333
Data1_D	3	47,33333	0,57735	0,33333
Data1_E	3	42,33333	3,05505	1,76383

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	4	116,933333	29,2333333	14,14516	0,00040
Error	10	20,6666667	2,06666667		

At the 0,05 level,
the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals	Significant at 0,05 Level
Data1_A	50		Lower Limit Upper Limit	
Data1_B	49,66667	0,33333	-3,5297 4,19636	No
Data1_C	48,66667	1,33333	-2,5297 5,19636	No
Data1_D	47,33333	2,66667	-1,19636 6,5297	No
Data1_E	42,33333	7,66667	3,80364 11,5297	Yes

Data1_B 49,66667

Data1_C	48,66667	1	-2,86303	4,86303	No
Data1_D	47,33333	2,33333	-1,5297	6,19636	No
Data1_E	42,33333	7,33333	3,4703	11,19636	Yes

Data1_C 48,66667

Data1_D	47,33333	1,33333	-2,5297	5,19636	No
Data1_E	42,33333	6,33333	2,4703	10,19636	Yes

Data1_D 47,33333

Data1_E	42,33333	5	1,13697	8,86303	Yes
---------	----------	---	---------	---------	-----

Dataset N Mean SD SE

PoliIver_A	3	50	0	0	Model
PoliIver_B	3	50	0	0	el
PoliIver_C	3	0	0	0	4
PoliIver_D	3	0	0	0	6000,
PoliIver_E	3	0	0	0	0000
					0
					1500,
					0000
					0 -
					-
					--

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

		Sum of	Mean		
Source	DoF	Squares	Square	F Value	P Value
Model	4	9000,00000	2250,00000	--	--
Error	10	0	0		

At the 0,05 level,
the population means are significantly different.

Error 10 0 0

At the 0,05 level,
the population means are significantly different.

RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>			
Fila 1	3	150	50	0	Polímero	A	Fila 1
Fila 2	3	150	50	0	Polímero+activo	B	Fila 2
Fila 3	3	150	50	0	Testigo	C	Fila 3
Fila 4	3	150	50	0	Ivermectina	D	Fila 4

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0	3	0	65535	#¡NUM!	4.066
Dentro de los grupos	0	8	0			
Total	0	11				

No son lógicos los datos, es evidente que son iguales.

No hay ningún cambio entre los diferentes tratamientos dado que es el día de aplicación

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Día2sinraton_A	3	49,66667	0,57735	0,33333
Día2sinraton_B	3	50	0	0
Día2sinraton_C	3	49,33333	0,57735	0,33333
Día2sinraton_D	3	0	0	0

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal
 Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	3	5550,91667	1850,30556	11101,83333	0,00000
Error	8	1,33333333	0,166666667		

At the 0,05 level,
 the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals Lower Limit	Upper Limit	Significant at 0,05 Level
Día2sinraton_A	49,66667				
Día2sinraton_B	50	-0,33333	-1,40078	0,73412	No
Día2sinraton_C	49,33333	0,33333	-0,73412	1,40078	No
Día2sinraton_D	0	49,66667	48,59922	50,73412	Yes

Día2sinraton_B 50

Día2sinraton_C	49,33333	0,66667	-0,40078	1,73412	No
Día2sinraton_D	0	50	48,93255	51,06745	Yes

Día2sinraton_C 49,33333

Día2sinraton_D	0	49,33333	48,26588	50,40078	Yes
----------------	---	----------	----------	----------	-----

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Día14sinraton_A	3	48,66667	0,57735	0,33333
Día14sinraton_B	3	0	0	0

Día14sinraton_C	3	47,33333	0,57735	0,33333
Día14sinraton_D	3	0	0	0

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal
Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	3	6914,66667	2304,88889	13829,33333	0,00000
Error	8	1,3333333	0,16666667		

At the 0,05 level,
the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals Lower Limit	Upper Limit	Significant at 0,05 Level
Día14sinraton_A	48,66667				
Día14sinraton_B	0	48,66667	47,59922	49,73412	Yes
Día14sinraton_C	47,33333	1,33333	0,26588	2,40078	Yes
Día14sinraton_D	0	48,66667	47,59922	49,73412	Yes

Día14sinraton_B	0				
Día14sinraton_C	47,33333	-47,33333	-48,40078	-46,26588	Yes
Día14sinraton_D	0	0	-1,06745	1,06745	No

Día14sinraton_C	47,33333				
Día14sinraton_D	0	47,33333	46,26588	48,40078	Yes

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Dia30sinraton_A	3	47,33333	0,57735	0,33333
Dia30sinraton_B	3	0	0	0
Dia30sinraton_C	3	46,66667	1,52753	0,88192
Dia30sinraton_D	3	0	0	0

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal
 Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	3	6627,66667	2209,22222	3313,83333	0,00000
Error	8	5,33333333	0,666666667		

At the 0,05 level,
 the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals	Significant at 0,05	Level
			Lower Limit	Upper Limit	
Dia30sinraton_A	47,33333				
Dia30sinraton_B	0	47,33333	45,19843	49,46823	Yes
Dia30sinraton_C	46,66667	0,66667	-1,46823	2,80157	No
Dia30sinraton_D	0	47,33333	45,19843	49,46823	Yes
Dia30sinraton_B	0				
Dia30sinraton_C	46,66667	-46,66667	-48,80157	-44,53177	Yes
Dia30sinraton_D	0	0	-2,1349	2,1349	No
Dia30sinraton_C	46,66667				
Dia30sinraton_D	0	46,66667	44,53177	48,80157	Yes

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Ivermectinaco_A	3	50	0	0
Ivermectinaco_B	3	18,66667	2,51661	1,45297
Ivermectinaco_C	3	9,33333	4,16333	2,4037
Ivermectinaco_D	3	0	0	0
Ivermectinaco_E	3	0	0	0
Ivermectinaco_F	3	0	0	0

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	5	5764,66667	1152,93333	292,29296	0,00000
Error	12	47,3333333	3,94444444		

At the 0,05 level,
the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals	Significant at 0,05
			Lower Limit Upper Limit	Level
Ivermectinaco_A	50			
Ivermectinaco_B	18,66667	31,33333	25,88646 36,7802	Yes

Ivermectinaco_C	9,33333	40,66667	35,2198	46,11354	Yes
Ivermectinaco_D	0	50	44,55313	55,44687	Yes
Ivermectinaco_E	0	50	44,55313	55,44687	Yes
Ivermectinaco_F	0	50	44,55313	55,44687	Yes

Ivermectinaco_B 18,66667

Ivermectinaco_C	9,33333	9,33333	3,88646	14,7802	Yes
Ivermectinaco_D	0	18,66667	13,2198	24,11354	Yes
Ivermectinaco_E	0	18,66667	13,2198	24,11354	Yes
Ivermectinaco_F	0	18,66667	13,2198	24,11354	Yes

Ivermectinaco_C 9,33333

Ivermectinaco_D	0	9,33333	3,88646	14,7802	Yes
Ivermectinaco_E	0	9,33333	3,88646	14,7802	Yes
Ivermectinaco_F	0	9,33333	3,88646	14,7802	Yes

Ivermectinaco_D 0

Ivermectinaco_E	0	0	-5,44687	5,44687	No
Ivermectinaco_F	0	0	-5,44687	5,44687	No

Ivermectinaco_E 0

Ivermectinaco_F	0	0	-5,44687	5,44687	No
-----------------	---	---	----------	---------	----

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE		
Conratonpolim_A	3	50	0	0	A	DÍA 0
Conratonpolim_B	3	48,66667	0,57735	0,33333	B	DÍA 1
Conratonpolim_C	3	47,33333	0,57735	0,33333	C	DÍA 5
Conratonpolim_D	3	45	2	1,1547	D	DÍA 7
Conratonpolim_E	3	40,66667	1,1547	0,66667	E	DÍA 14
Conratonpolim_F	3	37,33333	1,52753	0,88192	F	DÍA 30

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	5	363,833333	72,7666667	52,39200	0,00000
Error	12	16,6666667	1,38888889		

At the 0,05 level,
the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals	Significant at 0,05
			Lower Limit	Upper Limit
Conratonpolim_A	50			
Conratonpolim_B	48,66667	1,33333	-1,89879	4,56546

Conratonpolim_C	47,33333	2,66667	-0,56546	5,89879	No
Conratonpolim_D	45	5	1,76788	8,23212	Yes
Conratonpolim_E	40,66667	9,33333	6,10121	12,56546	Yes
Conratonpolim_F	37,33333	12,66667	9,43454	15,89879	Yes

Conratonpolim_B 48,66667

Conratonpolim_C	47,33333	1,33333	-1,89879	4,56546	No
Conratonpolim_D	45	3,66667	0,43454	6,89879	Yes
Conratonpolim_E	40,66667	8	4,76788	11,23212	Yes
Conratonpolim_F	37,33333	11,33333	8,10121	14,56546	Yes

Conratonpolim_C 47,33333

Conratonpolim_D	45	2,33333	-0,89879	5,56546	No
Conratonpolim_E	40,66667	6,66667	3,43454	9,89879	Yes
Conratonpolim_F	37,33333	10	6,76788	13,23212	Yes

Conratonpolim_D 45

Conratonpolim_E	40,66667	4,33333	1,10121	7,56546	Yes
Conratonpolim_F	37,33333	7,66667	4,43454	10,89879	Yes

Conratonpolim_E 40,66667

Conratonpolim_F	37,33333	3,33333	0,10121	6,56546	Yes
-----------------	----------	---------	---------	---------	-----

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Pollverraton_A	3	50	0	0
Pollverraton_B	3	45,33333	2,08167	1,20185
Pollverraton_C	3	40	1,73205	1
Pollverraton_D	3	37,33333	0,57735	0,33333
Pollverraton_E	3	34,33333	1,52753	0,88192
Pollverraton_F	3	31	3,60555	2,08167

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	5	744,000000	148,800000	38,81739	0,00000
Error	12	46,0000000	3,83333333		

At the 0,05 level,
the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals Lower Limit	Upper Limit	Significant at 0,05 Level
Pollverraton_A	50				
Pollverraton_B	45,33333	4,66667	-0,70294	10,03627	No
Pollverraton_C	40	10	4,6304	15,3696	Yes
Pollverraton_D	37,33333	12,66667	7,29706	18,03627	Yes
Pollverraton_E	34,33333	15,66667	10,29706	21,03627	Yes

Pollverraton_F	31	19	13,6304	24,3696	Yes
----------------	----	----	---------	---------	-----

Pollverraton_B 45,33333

Pollverraton_C	40	5,33333	-0,03627	10,70294	No
Pollverraton_D	37,33333	8	2,6304	13,3696	Yes
Pollverraton_E	34,33333	11	5,6304	16,3696	Yes
Pollverraton_F	31	14,33333	8,96373	19,70294	Yes

Pollverraton_C 40

Pollverraton_D	37,33333	2,66667	-2,70294	8,03627	No
Pollverraton_E	34,33333	5,66667	0,29706	11,03627	Yes
Pollverraton_F	31	9	3,6304	14,3696	Yes

Pollverraton_D 37,33333

Pollverraton_E	34,33333	3	-2,3696	8,3696	No
Pollverraton_F	31	6,33333	0,96373	11,70294	Yes

Pollverraton_E 34,33333

Pollverraton_F	31	3,33333	-2,03627	8,70294	No
----------------	----	---------	----------	---------	----

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Dialconraton_A	3	48,66667	0,57735	0,33333
Dialconraton_B	3	45,33333	2,08167	1,20185
Dialconraton_C	3	49,66667	0,57735	0,33333
Dialconraton_D	3	18,66667	2,51661	1,45297

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal
 Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	3	1952,25000	650,750000	229,67647	0,00000
Error	8	22,6666667	2,83333333		

At the 0,05 level,
 the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals	Significant at 0,05	Level
			Lower Limit	Upper Limit	
Dialconraton_A	48,66667				
Dialconraton_B	45,33333	3,33333	-1,06788	7,73454	No
Dialconraton_C	49,66667	-1	-5,40121	3,40121	No
Dialconraton_D	18,66667	30	25,59879	34,40121	Yes
Dialconraton_B	45,33333				
Dialconraton_C	49,66667	-4,33333	-8,73454	0,06788	No
Dialconraton_D	18,66667	26,66667	22,26546	31,06788	Yes
Dialconraton_C	49,66667				

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Dia5conrator_A	3	47,33333	0,57735	0,33333
Dia5conrator_B	3	40	1,73205	1
Dia5conrator_C	3	47,33333	0,57735	0,33333
Dia5conrator_D	3	9,33333	4,16333	2,4037

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	3	2952,00000	984,000000	187,42857	0,00000
Error	8	42,0000000	5,25000000		

At the 0,05 level,
the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals Lower Limit	Upper Limit	Significant at 0,05 Level
Dia5conrator_A	47,33333				
Dia5conrator_B	40	7,33333	1,34228	13,32438	Yes
Dia5conrator_C	47,33333	0	-5,99105	5,99105	No
Dia5conrator_D	9,33333	38	32,00895	43,99105	Yes
Dia5conrator_B	40				
Dia5conrator_C	47,33333	-7,33333	-13,32438	-1,34228	Yes
Dia5conrator_D	9,33333	30,66667	24,67562	36,65772	Yes
Dia5conrator_C	47,33333				
Dia5conrator_D	9,33333	38	32,00895	43,99105	Yes

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Dia7conratorn_A	3	45	2	1,1547
Dia7conratorn_B	3	37,33333	0,57735	0,33333
Dia7conratorn_C	3	46	1	0,57735
Dia7conratorn_D	3	0	0	0

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	3	4252,25000	1417,41667	1063,06250	0,00000
Error	8	10,6666667	1,33333333		

At the 0,05 level,
the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals Lower Limit	Upper Limit	Significant at 0,05 Level
Dia7conratorn_A	45				
Dia7conratorn_B	37,33333	7,66667	4,64746	10,68587	Yes
Dia7conratorn_C	46	-1	-4,01921	2,01921	No
Dia7conratorn_D	0	45	41,98079	48,01921	Yes

Dia7conratorn_B	37,33333				
Dia7conratorn_C	46	-8,66667	-11,68587	-5,64746	Yes
Dia7conratorn_D	0	37,33333	34,31413	40,35254	Yes

Dia7conratorn_C	46				
Dia7conratorn_D	0	46	42,98079	49,01921	Yes

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
Dial4conraton_A	3	40,66667	1,1547	0,66667
Dial4conraton_B	3	34,33333	1,52753	0,88192
Dial4conraton_C	3	43,66667	0,57735	0,33333
Dial4conraton_D	3	0	0	0

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal

Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	3	3656,66667	1218,88889	1218,88889	0,00000
Error	8	8,00000000	1,00000000		

At the 0,05 level,
the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals	Significant at 0,05
			Lower Limit Upper Limit	Level
Dial4conraton_A	40,66667			
Dial4conraton_B	34,33333	6,33333	3,71862 8,94804	Yes
Dial4conraton_C	43,66667	-3	-5,61471 -0,38529	Yes
Dial4conraton_D	0	40,66667	38,05196 43,28138	Yes
Dial4conraton_B	34,33333			
Dial4conraton_C	43,66667	-9,33333	-11,94804 -6,71862	Yes
Dial4conraton_D	0	34,33333	31,71862 36,94804	Yes
Dial4conraton_C	43,66667			
Dial4conraton_D	0	43,66667	41,05196 46,28138	Yes

One-Way ANOVA

Summary Statistics

Dataset	N	Mean	SD	SE
dia30conraton_A	3	37,33333	1,52753	0,88192
dia30conraton_B	3	31	3,60555	2,08167
dia30conraton_C	3	40,33333	1,52753	0,88192
dia30conraton_D	3	0	0	0

Null Hypothesis: The means of all selected datasets are equal
 Alternative Hypothesis: The means of one or more selected datasets are different

ANOVA

Source	DoF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	P Value
Model	3	3088,33333	1029,44444	233,08176	0,00000
Error	8	35,3333333	4,41666667		

At the 0,05 level,
 the population means are significantly different.

Means Comparison using Tukey Test

Dataset	Mean	Difference between Means	Simultaneous Confidence Intervals Lower Limit	Upper Limit	Significant at 0,05 Level
dia30conraton_A	37,33333				
dia30conraton_B	31	6,33333	0,8383	11,82837	Yes
dia30conraton_C	40,33333	-3	-8,49504	2,49504	No
dia30conraton_D	0	37,33333	31,8383	42,82837	Yes
dia30conraton_B	31				
dia30conraton_C	40,33333	-9,33333	-14,82837	-3,8383	Yes
dia30conraton_D	0	31	25,50496	36,49504	Yes
dia30conraton_C	40,33333				
dia30conraton_D	0	40,33333	34,8383	45,82837	Yes