



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE SISTEMAS NANOPARTÍCULADOS EN LARVAS DE
GARRPATAS BOOPHILUS MICROPLUS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

ROGELIO FLORES MARTÍNEZ

MÉXICO, D.F.

AÑO 2010





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: BERNARDO LUCAS FLORENTINO

VOCAL: Profesor: NORMA TRINIDAD GONZALEZ MONZON

SECRETARIO: Profesor: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD

1er. SUPLENTE: Profesor: CARLOS PEREZ MUÑOZ

2° SUPLENTE: Profesor: JOAQUIN GONZALEZ ROBLEDO

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

ASESOR DEL TEMA: DRA. MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay): MARÍA DE GUADALUPE DÍAZ NANCLARES.

(nombre y firma)

SUSTENTANTE (S): ROGELIO FLORES MARTÍNEZ

(nombre (s) y firma (s))

Existiendo mil y un razones para que este trabajo se haya realizado, son múltiples las personas a las cuales debo agradecer por ayudarme a llegar al final de mi sendero, desde aquellas maravillosas estampas que cambiaron mi vida al sólo cruzar una mira en mi destino. Hasta los maravillosos amigos que sin saberlo me mostraron de nuevo el camino, cuando este parecía perdido, en medio de risas y chistes que sólo en ocasiones parecían entenderse, al enlazarse al conocimiento o algún profesor; así como también agradecerles a aquellos que me abrieron las puertas en su lugar de inspiración, donde surgen nuevos hallazgos, nuevas formulas y el descanso pareciera desvanecerse conforme el cielo camina entre las nubes.

Y nada sería más desleal que no agradecer a los múltiples formadores de nuevos profesionistas, que tras desvelos y mucho trabajo nos brindan gran parte de su tiempo, para que tan sólo entendamos la complejidad de la simpleza de un átomo y su interacción con el campo biológico.

En el lugar más especial se encuentran las personas que a lo largo de mi vida me han brindado las bases de mi ser y los fundadores de mi existencia, y sobre todo la principal estructura de mi alma, las ramas que por parte de mis padres en mí se enlazan.

A todos ustedes sólo puedo decirles gracias por su apoyo.

Contenido

I. Resumen.....	2
II. Introducción.....	4
III. Antecedentes.....	7
3.1 GARRAPATAS.....	7
3.1.1. La Garrapata del Género <i>Boophilus microplus</i>	10
3.1.2. Ivermectina.....	13
3.1.2. Estudios de tratamientos novedosos contra garrapatas.....	18
3.2. SISTEMAS DE LIBERACION CONTROLADA.....	19
3.2.1. Vectorización de fármacos.....	25
3.2.2. Modificación en superficie.....	39
3.3. LIBERACIÓN MODIFICADA DE IVERMECTINA.....	39
IV. Objetivos.....	42
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	42
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	42
V. Parte experimental.....	43
5.1. MATERIAL.....	43
5.1.1. Reactivos.....	43
5.1.2. Material biológico.....	43
5.1.3. Instrumentos y Equipos.....	43
5.2. METODOLOGÍA.....	44
5.2.1. Elaboración de las nanopartículas.....	44
5.2.2. Caracterización de las Nanopartículas.....	45
5.2.3. Estudios con larvas de garrapata.....	45
5.2.4. Estudios toxicológicos.....	48
VI. Resultados y Discusión.....	49
6.1. ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.....	49
6.2. PRUEBAS DE EFECTIVIDAD SOBRE LARVAS DE GARRAPATAS <i>Boophilus microplus</i>	58
6.2.1. Resultados de la prueba Shaw y Stone.....	59
6.3 PERFILES DE TOXICIDAD DE LOS COMPONENTES DE LAS NANOPARTÍCULAS.....	68
6.3.1. Estudio Histopatológico.....	78
VII. Conclusiones.....	84
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	85

I. Resumen.

Las enfermedades transmitidas por las garrapatas son distribuidas en gran parte del mundo. El tratamiento habitual para estas ectoparasitosis consiste en baños de inmersión, métodos de aspersion y/o inyectables de relativamente corta acción. Lo anterior hace que el manejo de los animales sea estresante para los mismos, haciendo que éstos pierdan peso y por lo tanto haya pérdidas económicas importantes.

Se están diseñado formas de liberación prolongada que mantienen concentraciones con efecto garrapaticida durante un mayor tiempo, para lo cual se están empleando polímeros biodegradables que son de vital importancia; ya que éstos pueden ser administrados por implantes subcutáneos que permiten al fármaco irse liberando paulatinamente, con el fin de mantener una concentración activa constante y efectiva.

En este trabajo se llevaron a cabo estudios de porcentaje de mortalidad en larvas de garrapata ***Boophilus microplus***, al igual que se realizaron perfiles de toxicidad para los componentes de las nanopartículas y su caracterización, la cual se realizó por medio de la medición de potencial Z, tamaño de partícula y mediante la realización de termogramas para cada componente (Brij56, Isopropanol, Polietilenglicol 6000 y Policaprolactona- ϵ). El tamaño de partícula obtenido fue de *aproximadamente* 200nm con un potencial zeta de -20 mV. Las nanopartículas y los componentes se probaron en larvas de garrapatas ***Boophilus microplus***, con la finalidad de cerciorarnos que no influyeran en la mortalidad de las larvas; se encontró que ninguno de los componentes presentaba efecto sobre las larvas, excepto la ivermectina; sin embargo existía un porcentaje de mortalidad en el momento de evaluar las nanopartículas; lo que llevó a realizar estudios de perfiles toxicológicos de cada uno de los componentes y las nanopartículas; éstos se llevaron a cabo en ratones hembras ICR con un peso entre 25g a 30g en los cuales se les administraron partículas y componentes por vía intraperitoneal y posteriormente se les extrajeron los siguientes órganos: pulmón, corazón, riñón,

hígado y bazo; a dichos órganos se les realizó un estudio histopatológico con la finalidad de observar si existía daño alguno, en los órganos mencionados no se encontró daño; sin embargo en el caso del aceite de ricino y del Brij56 se encontró un DL50 para el caso del Brij56 de 200mg/Kg y para el aceite de ricino de 2000mg/Kg dicho parámetro no afecta en nuestro estudio, ya que nuestras concentraciones llegan a ser de 100 a 1000 veces inferiores.

II. Introducción.

Las enfermedades transmitidas por las garrapatas son distribuidas en gran parte del mundo, sobre todo en las zonas tropicales y subtropicales. Se estima que el ochenta por ciento de la población del ganado mundial está expuesto a ser infectado por estos ectoparásitos.

Las pérdidas causadas directamente por las garrapatas son la pérdida de sangre, daño en la piel por la picadura y la inyección de toxinas. Además se ve afectada la ganancia de peso de los animales y la producción de leche. Las garrapatas también producen bajas en la fertilidad del ganado, mayor tiempo de engorda y dificultad en la importación de razas mejoradas para incrementar la calidad genética en áreas infestadas por garrapatas. Indirectamente afectan al ganado en cuanto a debilidad y mortalidad, esto debido a los agentes que transmiten principalmente la garrapata del género **Boophilus**, tales como **Babesia bovis**, **Babesia bigemina** y **Anaplasma marginale**.

La especie más relevante para la ganadería bovina es **Boophilus microplus**, debido a su amplia distribución, a los daños que ocasiona y a la transmisión de agentes como **Babesia sp**; dicha especie de garrapata presenta en el país un área de distribución que abarca zonas tropicales, templadas y áridas; que en conjunto se considera que cubre 1,043,772 Km², lo que representa el 53.0% del territorio nacional. El 27.0% lo abarca la especie *B. annulatus*, presentando una mayor afinidad por zonas áridas y templadas, abarcando una superficie aproximada de 539,087 Km² y el 31.0% lo comprende **Amblyomma cajennense** que es la especie del género con mayor área de distribución en México, la cual

cubre una superficie aproximada de 609, 857 Km². Esta distribución se debe a la intensidad de los tratamientos con garrapaticidas en contra de *B. microplus*; lo cual ayudó a que *A. cajennense* ocupara el hábitat de *B. microplus*.

Diversos métodos se han propuesto para el control de las garrapatas; pero el método químico, el cual es utilizado a una frecuencia de tratamientos variables dependiendo del nivel de infestación de los animales; es el que ha tenido mayor aceptación debido a las facilidades que presenta, su eficiencia y su efecto rápido. Además el método químico utilizado como herramienta de control, se puede aplicar considerando varias estrategias de aplicación y formulación del producto, la selección depende de la idiosincrasia de los productores, recursos disponibles y el impacto económico al sistema productivo.

Actualmente existen seis grupos de productos químicos que se utilizan para el control de garrapatas en México. Estos se dividen en: Organofosforados, Piretroides, Amidinas, Endectocidas (lactonas macrocíclicas que incrementan la liberación del ácido gammaaminobutírico (GABA) del sistema nervioso de los insectos), Fenilpirazolonas e Inhibidores del desarrollo; aunque estos garrapaticidas han sido utilizados con éxito en el control de las garrapatas, su uso irracional ha ocasionado la generación de cepas de garrapatas *B. microplus* resistentes a la acción de la mayoría de estos productos químicos; incluso algunos de estos compuestos han sido abandonados o incluso prohibidos debido a problemas de alta toxicidad para el ganado y el ser humano; otros, por el riesgo que implica su uso masivo para la ecología. Además se encuentran disponibles en el mercado mezclas de dos productos químicos, para los cuales se recomiendan un uso cuidadoso por el riesgo de generar de manera más rápida el proceso de resistencia.

Los productos químicos son frecuentemente administrados para lograr tener un control prolongado en estas patologías, por lo cual se ha optado por la utilización de sistemas económicamente viables que liberen el activo lentamente, a efectos de que el control se ejerza durante largos períodos. Por ejemplo, la actividad residual de una inyección de ivermectina en terneros se prolonga por tres

semanas y es sistemáticamente activo a niveles entre 1 y 20µg/kg/día, lo que fundamenta su utilización en sistemas de liberación lenta controlada.

Si se logra diseñar una forma de liberación prolongada que mantenga concentraciones garrapaticidas 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 ivermectina. Para lograr esto se están diseñando nuevas formulaciones en las que los polímeros biodegradables, como los sintetizados con ácido láctico, con ácido glicólico, policaprolactona etc. son de vital importancia porque desempeñan dos funciones principales como encapsuladores (medios de protección) y como “carriers” (reguladores de la liberación); éstos pueden ser administrados por implantes subcutáneos que permiten al fármaco irse liberando paulatinamente, con el fin de mantener una concentración activa constante y efectiva.

Por lo anteriormente expuesto, se han diseñado diversas formulaciones en el grupo de trabajo del laboratorio de la Dra. Josefa Bernad Bernad; pero el presente trabajo se enfoca principalmente a aquellas que consisten de nanopartículas elaboradas con policaprolactona o con copolímero de ácido láctico-glicólico. En las nanopartículas elaboradas se emplea como fármaco principal la ivermectina, el cual es un antiparasitario de interés para la medicina veterinaria debido a que este fármaco es utilizado ampliamente en el control y tratamiento de diversas infecciones causadas por nemátodos y artrópodos que atacan diversas variedades de ganado y animales domésticos. En la presente tesis se realizaron estudios para comprobar la efectividad de estas formulaciones en larvas de garrapata *Bophilus microplus* (empleando las metodologías de Shaw y Stoke), otorgadas por el departamento de parasitología de la facultad de Veterinaria y Zootecnia; además se llevó a cabo un perfil toxicológico de cada uno de los excipientes y/o de las formulaciones en ratones ICR con un peso entre 25 y 30g, para observar la toxicidad a diversas concentraciones.

III. Antecedentes.

3.1 GARRAPATAS.

La garrapata es uno de los ectoparásitos de mayor importancia económica a escala mundial por las mermas que ocasiona en la producción de ganado bovino y caprino. Los efectos físicos y las pérdidas por infecciones son:

- .- Pérdidas de sangre; cada garrapata en su ciclo consume de 2 a 3 ml.
- .- Desnutrición; las molestias de la irritación que provoca la picadura hacen que el animal esté inquieto, se rasque y coma mal, lo cual implica una desnutrición paulatina.
- .- Enfermedades; las garrapatas del género *Boophilus* son transmisores de agentes infecciosos como son la *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* y *Anaplasma marginale*, que son los causales de enfermedades como Piroplasmosis y Anaplasmosis, ésta última forma un complejo sistema que incluye a otros sistemas hematófagos e incluso algunos factores mecánicos, dichos agentes de infección son introducidos mediante la saliva durante la picadura.(1-2)

Las garrapatas pueden servir de agentes transmisores de bacterias, virus, hongos, que producen otras enfermedades agudas o crónicas, que pueden llegar a producir la muerte del bovino. Se ha comprobado estadísticamente que una infestación diaria promedio de 50 garrapatas adultas sobre el animal, causa en el ganado una pérdida de peso anual de 800 gr. o sea 40 kg de carne por animal y por año. (1)

- .- Depreciación de las pieles a causa de las perforaciones producidas por los piquetes

Las garrapatas tienen cuatro estados evolutivos en su ciclo vital, que son: el huevo, la larva o pinolillo, la ninfa y el adulto. El desarrollo de las garrapatas ocurre en 1, 2 ó 3 hospederos por lo que se denominan garrapatas de 1, 2 ó 3 hospederos. Las garrapatas del género *Boophilus* son de un solo hospedero, mientras que las garrapatas del género *Amblyomma* son de tres hospederos. Para que las garrapatas logren su desarrollo, es necesario que cursen por tres fases: No parasítica, de encuentro y parasítica.(3-4)

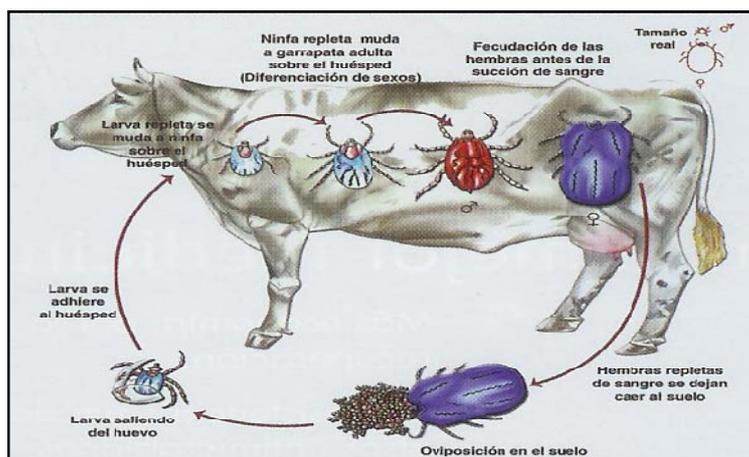


Figura 1. Ciclo biológico de la garrapata **Boophilus microplus** (garrapata de 1 hospedero).

La fase no parasítica comprende desde que la garrapata hembra repleta se desprende de su hospedero hasta la aparición de las larvas en la vegetación. Esta fase se divide en cinco períodos:

- .- Preoviposición: Comprende desde el desprendimiento de la garrapata repleta del hospedero hasta la postura del primer huevo. La garrapata *B. microplus* experimenta repleción final (un llenado de sangre), lo cual principalmente sucede durante la noche y se desprende al comienzo de la mañana. Al caer la garrapata al suelo busca lugares sombreados y protegidos para poder iniciar el proceso de oviposición.(3-4)
- .- Oviposición: comienza con la puesta de los primeros huevos hasta los últimos, este periodo puede ser seriamente afectado por factores ambientales como la radiación solar directa, la cual puede destruir a los huevos.
- .- Postoviposición: es el periodo desde que la garrapata repleta pone el último huevo hasta que muere.
- .- Incubación: comprende desde que se inicia la oviposición hasta la emergencia de las larvas, pudiéndose ver afectado por factores ambientales como son la humedad
- .- Eclosión: en este periodo la larva emerge del huevo, los mejores porcentajes de eclosión se obtienen en temporadas que tienen una temperatura óptima de 25-

35°C y una humedad relativa del 95%. Bajo condiciones controladas en el laboratorio el porcentaje de eclosión de *B. microplus* es superior al 80%. (3-4)

La fase de encuentro se define como el proceso de transferencia de las larvas desde la vegetación al hospedero y está influenciada por variables básicas como la distribución, longevidad, ritmos de actividad de las larvas, la estructura y tipo de vegetación, así como la densidad de bovinos y aspectos relacionados con su comportamiento en el pastizal; esta fase comprende dos períodos: pasivo y búsqueda:

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

.- Periodo de búsqueda. Es el tiempo que transcurre entre el periodo pasivo y el encuentro del hospedero, este periodo es uno de los más críticos en la vida de las garrapatas ya que necesitan encontrar un hospedero adecuado, nutrirse y completar su ciclo; las larvas utilizan su capacidad de sobrevivencia para resistir los efectos del medio ambiente, este evento está influenciado por diversos factores, considerándose de mayor importancia las condiciones ambientales; principalmente la temperatura y la humedad ambiental, ya que si la temperatura aumenta, la duración de dicha fase disminuye. Mientras que con la humedad se ha observado que en los meses más húmedos se presenta una mayor longevidad en comparación con los meses secos; el otro factor de vital importancia son las reservas nutritivas, las cuales afectan directamente a la longevidad, densidad y actividad de las larvas. Éstas ven incrementada su actividad cuando son estimuladas por el desprendimiento de dióxido de carbono (CO₂) de la piel de los animales; lo que provoca en ellas adoptar una posición particular, al sostenerse en sus dos patas posteriores, extendiendo el par anterior, para tratar de adherirse al posible hospedero.(3-4)

La última de las fases, la fase parasítica, comprende una serie de eventos patológicos sobre el hospedero que conlleva a las pérdidas directas e indirectas ocasionadas por las presencia de estados de ninfas y adultos.

En esta fase las larvas requieren superar algunas barreras del hospedero, como el tipo de pelo (ya que la espesura, la capilarización, densidad de glándulas sudoríparas y sebáceas, le ofrecen resistencia), la posibilidad de ser alcanzadas durante el proceso de acicalamiento, y el aspecto competitivo con otras especies de garrapatas, lo cual restringe la incorporación de nuevos individuos.

El desenvolvimiento de la garrapata adulta está íntimamente relacionado a la fisiología del hospedero, ya que éste es el microclima donde se desarrolla; y por lo tanto se ve poco afectado por condiciones medioambientales.(3-4)

3.1.1. La Garrapata del Género *Boophilus microplus*.

La garrapata ***Boophilus*** es un ectoparásito de un solo huésped y completa su ciclo en menor tiempo, ésta parasita casi exclusivamente al ganado bovino, produce hasta cuatro generaciones de garrapatas en un año bajo óptimas condiciones de humedad y temperatura, transmitiendo la enfermedad conocida como piroplasmosis bovina (Babesiosis). Este ectoparásito presenta amplia distribución mundial, es originario de Asia, lugar donde se desarrolló por miles de años en estrecho contacto con el ganado cebú.(2-3, 5)

A partir de la colonización del nuevo mundo junto con el ganado son trasladadas las plagas, una de ellas tal vez de las más importantes lo fue la garrapata ***Boophilus***, la cual encontró en el continente americano óptimas condiciones para su desarrollo y diseminación. Desde aquellos años comenzó el combate contra el ectoparásito, acción que no ha cesado hasta nuestros días realizándose de diversas maneras.(4)

Los esfuerzos organizados en México se iniciaron en los años sesenta para lograr la erradicación de la plaga en el estado de Sonora. Posteriormente se constituyó el Fideicomiso Campaña Nacional contra la Garrapata de 1974 a 1984, mismo que incrementó la infraestructura en baños de inmersión, destinados al control. Estos lograron erradicar el parásito en gran parte de los Estados del Norte. Desafortunadamente se suspendieron las acciones de erradicación y la favorable ecología para el desarrollo de *Boophilus* en México provocó la reinfestación de áreas en las que anteriormente se había erradicado.(4)

El ácaro es un parásito obligado del ganado bovino; cumple su ciclo de vida en un sólo animal por lo que es llamada garrapata de un solo huésped. Presenta dos especies en México ***B. microplus*** y ***B. annulatus***; cuya distribución obedece a las condiciones medioambientales requeridas para su desarrollo y reproducción. Las regiones semiáridas de B. California, Coahuila, Durango, Norte de Sinaloa, Norte de Nuevo León y Norte de Tamaulipas son preferidas por ***annulatus*** mientras que ***microplus*** se presenta en las zonas tropicales del Golfo de México, Océano Pacífico y península de Yucatán; siendo ésta última especie (***B. microplus***) la de interés para el presente trabajo; por lo cual se hablará básicamente de las características de esta especie de garrapata.(2-4)

Las garrapatas de la especie ***Boophilus microplus*** presentan la característica de que la fase parasítica (larva, ninfa y adulta) ocurre sobre el mismo hospedero. El ciclo ocurre de la siguiente manera: la larva que se alimenta, muda a ninfa y posteriormente a adulta. Los machos y las hembras copulan, y la hembra queda grávida (cargada) para desprenderse y caer al suelo e iniciar la fase no parasítica y de encuentro; esta etapa del ciclo biológico de ***B. microplus*** dura aproximadamente de 19 a 21 días en condiciones óptimas; además cabe mencionar que una hembra repleta de ***B. microplus*** pone de 2,500-3,500 huevos.(2-3)



Figura 2 Hembra de ***Boophilus microplus*** repleta, que parasita al ganado bovino del trópico Mexicano.

El siguiente cuadro muestra una cronología de la evolución de *B. microplus*:

CRONOLOGIA EVOLUTIVA	DIAS
Período de preoviposición.	2-39
Período de oviposición.	4-44
Incubación de huevos.	14-146
Alimentación de la larva y muda. (metamorfosis)	7-10
Alimentación de la ninfa y muda.	5-12
Alimentación de la hembra adulta.	5-12
Supervivencia de la larva en ayuno.	240 ó más

Por las características mencionadas, con respecto al ciclo de vida de las garrapatas del género *Boophilus*, se ideó y se siguió una estrategia de tratamientos para erradicar dicho ectoparásito en la campaña nacional iniciada en 1974. El tratamiento fue catorcenal y se aplicó en todo el ganado, estuviera o no infestado, esto obligó a dar poco más de 24 tratamientos de organofosforados al año. Sin embargo, a pesar que la campaña fue suspendida con la estrategia de erradicación, la mayoría de los ganaderos en las regiones tropicales y subtropicales continuaron bajo ese esquema de tratamientos, ello originó en un principio una notable disminución de las infestaciones; sin embargo a mediano plazo se presentó un fenómeno que ya aparecía en otros lados del mundo y que se conoce como resistencia.(4)

La resistencia es definida como la capacidad heredable de la población parasitaria de reducir su sensibilidad a la acción de uno o más fármacos, que en condiciones normales causarían la inhibición del crecimiento o la muerte. Esta particularidad se da por algún tipo de cambio genético en el individuo que hace posible evadir o resistir el efecto inducido por un determinado fármaco. El desarrollo de resistencia a las sustancias químicas es un problema constante en el control de garrapatas, ácaros e insectos, ya que las repetidas aplicaciones de un mismo producto durante mucho tiempo y el uso de dosis subletales ocasionan la aparición de ésta.(4, 6-7)

Una vez que aparece la resistencia no hay nada que se pueda hacer para que vuelvan a ser garrapatas susceptibles; por ello es que se debe demorar el

desarrollo de resistencia a los productos químicos que actualmente se usan; para lograr esto se debe controlar la concentración y aplicación del producto en tiempo y forma, para que no queden garrapatas vivas que puedan producir colonias de garrapatas resistentes.(7-8)

Los primeros problemas de resistencia a los ixodicidas aparecieron en 1981 en el Estado de Veracruz a los siete años de iniciados los tratamientos intensivos y fue contra los organofosforados, los cuales inhiben la actividad de la enzima acetilcolinesterasa; produciendo un aumento de estímulos nerviosos de los insectos; estos compuestos son lipofílicos y por lo tanto se absorben fácilmente a través de la piel y se acumulan en tejido adiposo donde son liberados lentamente a la sangre y otros líquidos fisiológicos. Tienen una permanencia de 4 a 8 días. Algunos ejemplos de estos principios activos son: Clorfenvinfos, Clorpirifos, Coumafos y Diazinón.(4, 7)

Debido a que se produjo resistencia a los compuestos organofosforados, se tuvieron que realizar cambios en los productos a utilizar en esas regiones, dando lugar al uso de los piretroides y amidinas. Los piretroides provocan un bloqueo de la actividad motriz o bien por la producción de excitabilidad, incoordinación de movimientos, irritabilidad, parálisis, letargo y muerte del insecto; éstos presentan un efecto residual de aproximadamente 15 días. Algunos ejemplos de estos fármacos son: cipermetrina, deltametrina y flumetrina. Por otro lado, las amidinas ocasionan la muerte del insecto por inhibición de las monoaminooxidasas, aunque, no se ha dilucidado la posible participación de los receptores de la octopamina. El producto de mayor uso es el amitraz.(4, 7)

El uso de estos garrapaticidas se intensificó desde 1985 hasta 1993 en que aparece de nueva cuenta la resistencia a piretroides y organofosforados al mismo tiempo en Tamaulipas y posteriormente en toda la costa del Golfo de México. Estos últimos hallazgos obligaron al replanteamiento de las estrategias de control que se seguían hasta esos momentos.(4)

3.1.2. Ivermectina.

En las últimas décadas el uso de ivermectina se ha convertido en una de las alternativas de tratamiento de mayor eficacia y uso frecuente por parte de los

ganaderos, debido a que se trata de un antihelmíntico de amplio espectro activo frente a formas adultas e inmaduras de nematodos y artrópodos (insectos, garrapatas y ácaros) que atacan diversas variedades de ganado y animales domésticos.(9-10)

Proviene de un actinomiceto cuyo género y especie es *Streptomyces avermitilis*, el cual fue aislado en el año 1978 en el Instituto Kitasato en Japón. Este actinomiceto se sometió a un proceso fermentativo y de este modo se obtuvo una lactona macrocíclica a la que se denominó avermectina. El primer preparado fue sintetizado en 1980 y se usó de manera comercial en medicina veterinaria en 1981. La avermectina es el precursor de todas las ivermectinas; de esta molécula se obtienen 8 compuestos (cuatro mayores y cuatro menores), que al combinarse unos con otros, generan una ivermectina diferente con algunas variantes en cuanto a espectro o efecto residual. La estructura química de la avermectinas se presenta en la figura 3. (9-11)

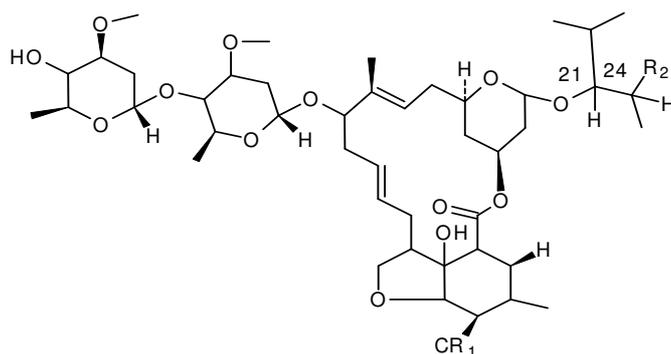
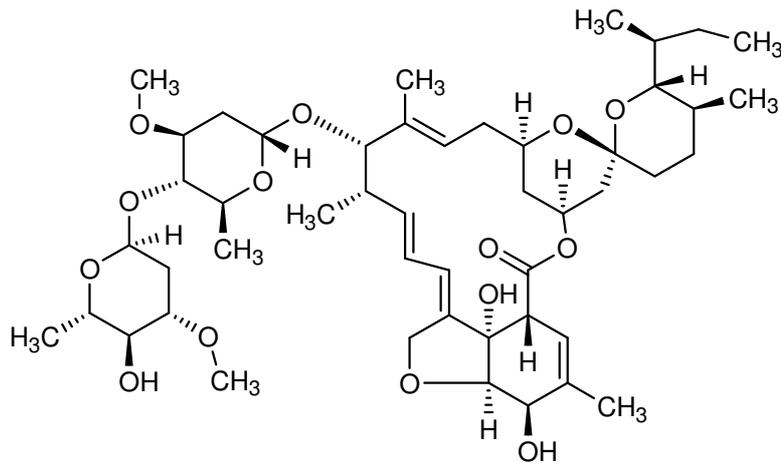


Figura 3. Fórmula básica del anillo lactona macrocíclico de las ivermectinas.

La ivermectina contiene 90% de 22-23 dihidroavermectin B1a y 10% de 22-23 dihidro-avermectin B1b (Fig. 4), fue seleccionada como candidata para el desarrollo comercial porque presentó características superiores de mezcla, eficacia y seguridad.(11-12)

Ivermectina B1a



Ivermectina B2b

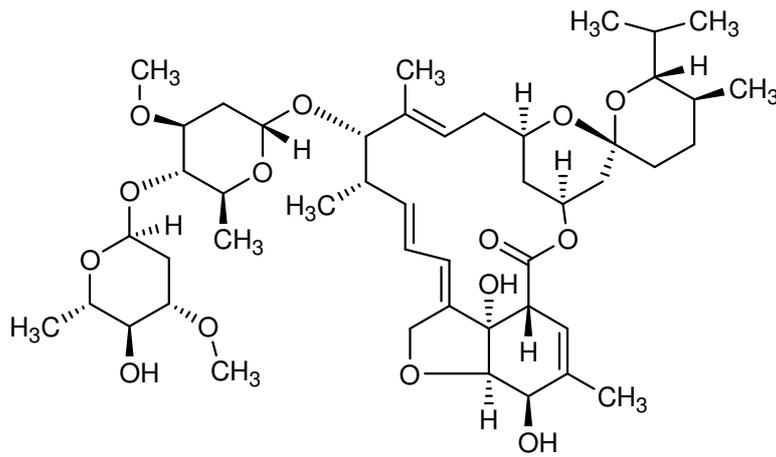


Figura 4. Estructura Química de la Ivermectina.

Las características físico-químicas son las siguientes:

Fórmula química	B1a: C ₄₈ H ₇₄ O ₁₄
	B1b: C ₄₇ H ₇₂ O ₁₄
Peso molecular	B1a: 875.10 g/mol
	B1b: 861.1 g/mol
ρ relativa	1.1268 g/cm ³
Punto de fusión	155 ° C
Solubilidad en agua	Insoluble
Estado	Sólido
Log P/ Hidrofobia	6,704
Toxicidad	LD50 29.5 mg/kg (ratón, vía oral). LD50 10 mg/kg (rata, vía oral). Los efectos adversos son dolor muscular o abdominal, vértigo, fiebre, dolor de cabeza, salpullido, ritmo cardiaco acelerado.
Unión a proteínas	93%
Tiempo de vida media	16 horas (también se reportan de 22 a 28 h) en animales de pastoreo.
Almacenamiento	Mantener los paquetes bien cerrados, en un lugar seco, protegidos de la luz y del calor. Límites de temperatura de conservación sugeridos: 0-30° C.

3.1.2.1. Mecanismo de acción.

La ivermectina inmoviliza a los organismos afectados al inducir parálisis tónica de sus músculos. Su mecanismo de acción involucra tanto la potenciación de los efectos del ácido γ-amino butírico (GABA), un neurotransmisor inhibitorio de las respuestas motoras de los parásitos (Fischer y col 1993), como la interacción con canales glutamato-cloruro independientes de GABA, incrementando la permeabilidad de la membrana celular de las neuronas del parásito a los iones cloruro; causando una entrada de cloro y como consecuencia una hiperpolarización de la membrana celular. De esta manera la ivermectina causa bloqueo neuromuscular, resultando en parálisis flácida y la eventual muerte del parásito (McKellar y Benchaoui 1996). Las avermectinas interactúan con los receptores de GABA en el cerebro de vertebrados (mamíferos), pero su afinidad por receptores de invertebrados es unas 100 veces mayor.(9, 12-13)

Cabe mencionar que algunos mamíferos son sensibles a las ivermectinas, ya sea por edad o raza. Se ha visto que la intoxicación en animales jóvenes puede ser mortal, particularmente en el caso de gatitos y cachorros menores de 6 semanas de edad y en algunos potros, al ser administradas por vía oral, puede causar de una ligera intoxicación hasta la muerte del animal.(11, 14)

Se ha informado que no es conveniente administrar a las vacas lactantes ni en producción porque su período de eliminación es muy prolongado y resulta antieconómico. No afecta la producción de espermatozoides ni el volumen del semen en los toros. A dosis tan altas como 8 mg/kg de peso corporal por vía subcutánea produjo intranquilidad, ataxia y muerte en algunos casos.(13)

3.1.2.2. Farmacocinética.

La ivermectina presenta un alto volumen de distribución, con gran afinidad por la grasa corporal y prolongada persistencia de sus concentraciones en el organismo, esto se debe a la elevada lipofiliidad y gran peso molecular de la ivermectina.(10) Habitualmente se usa a una dosis de 200 µg/kg por vía subcutánea, ya que por vía intramuscular induce necrosis tisular. También se ha visto que se puede administrar por vía oral con la desventaja de que se debe aplicar cuando menos el doble de la dosis dado que su biodisponibilidad es limitada. Por vía intrarruminal, la presentación en forma de bolos permite una biodisponibilidad del fármaco del 40 % y dura de siete a catorce días en el plasma. Se ha observado que a una dosis bajas de 10 a 40 µg/kg/día puede ser eficaz para el control de las infestaciones por parásitos sensibles al medicamento. Se distribuye en todo el organismo, aunque se concentra en bilis, hígado y grasa. Atraviesa poco o nada la barrera hematoencefálica. En el ganado, los residuos de las ivermectinas son detectables en plasma desde una hora hasta 80 días posteriores a la administración de la dosis subcutánea de 200 µg/kg de peso corporal.(15)

Parece ser que la biotransformación se realiza por procesos de hidroxilación dentro y fuera del sistema microsomal, incluso ruminal o intestinal. El porcentaje de recuperación de metabolitos en plasma puede ser de un 91.5%, hasta por 80 días después de una administración por vía subcutánea.(11)

La duración de concentraciones terapéuticas depende de los vehículos y presentaciones de los fármacos. Como ejemplo, las presentaciones en forma de bolos de liberación lenta para ganado bovino logran dosis terapéuticas de aproximadamente 12 mg de ivermectina por día, en un periodo aproximado de 135 días y después de la administración subcutánea de una dosis de 200 µg/kg resulta eficaz de 14 días a 21 días. Después de una administración transdérmica a dosis de 500 µg/kg es eficaz de 14 días a 28 días.(7)

Se ha observado que el tratamiento con ivermectina en altas concentraciones causa embriotoxicidad en animales. Siendo más sensibles los ratones de menor edad, en comparación con los ratones adultos y se ha observado menor toxicidad en los primates incluyendo el hombre. Su excreción es independiente de la vía de administración y se elimina por heces hasta un 98%, orina en 1% y en hembras en lactancia una fracción significativa (5% de la dosis) tiene una prolongada vida media, su uso está prohibido en animales en lactancia, cuyo producto sea destinado a consumo humano y se recomienda que su uso en vacas gestantes se realice a lo menos con una anticipación de 28 días previos al parto.(11-12)

3.1.2. Estudios de tratamientos novedosos contra garrapatas

Algunos tratamientos novedosos que están surgiendo en el mercado, para el tratamiento contra garrapatas son aquellos en los cuales se promueve la acción prolongada del fármaco dado que de este modo se evita la continúa dosificación en el animal y por ende se evita estrés en el animal; además de que se reduce costo y tiempo.

Entre los tratamientos más novedosos se encuentra, los denominados “oil-based liquids” los cuales consisten en preparar una suspensión del fármaco cercana a la sobresaturación, esté al momento de inyectarse lentamente propicia una ligera precipitación del fármaco en el sitio de inyección, propiciando de este modo que esté se vaya liberando poco a poco. Un ejemplo de este método es el “Ivomec” el cual contiene una solución de ivermectina en propilenglicol y glicerol, este combina la vida media del fármaco con la ayuda de un sistema no acuoso prolongan su acción alrededor de un mes.(16)

Otro método novedoso; aunque de forma tópica, en contra de lo ectoparásitos es el denominado “oil-based systems: spot-on” este no son más que productos de bajo volumen que son colocados directamente en el trasero del animal y el tiempo que se mantenga el fármaco en el sitio de acción, sólo depende directamente de las propiedades de los agentes activos y los excipientes que promueven la adherencia del fármaco en la piel. Un ejemplo de este medicamento es Ivomec pour-on es un producto de bajo volumen que es aplicado directamente en el trasero de animal y es eficaz debido a la farmacocinética prolongada del principio activo; siendo suficientemente absorbido el fármaco y es eficaz por alrededor de 28 días. (17-18)

Otro método que aun no es muy bueno pero que se ha ido mejorando son los collares, los cuales se basan en combinar un líquido o un sólido con el agente activo, el cual debe ser no volátil, de tal modo que estos no sean compatibles con la matriz polimérica del collar lo que propicia que fluya el principio activo hacia la piel del animal.(17)

3.2. SISTEMAS DE LIBERACION CONTROLADA.

El concepto de Sistema de Liberación Controlada de Fármacos (Drug Delivery Systems) surgió en la década de los 70 y tiene por objeto mejorar las propiedades terapéuticas de los fármacos incorporándolos en un sistema que permita su liberación a la velocidad adecuada y/o en el entorno adecuado del organismo. (12) Las forma farmacéuticas convencionales proveen una concentración alta de fármaco en el plasma sanguíneo, de modo que los niveles de agente activo crecen rápidamente y luego decaen a medida que el fármaco es metabolizado y excretado; esta concentración se puede prolongar aumentando la cantidad de fármaco administrado, sin embargo; en algunos casos, esto puede generar concentraciones en el plasma sanguíneo superiores a los niveles tóxicos, por lo que ésta no es una solución adecuada al problema. Por ello, se desarrollaron los sistemas de liberación controlada, ya que en estos sistemas logran dosificar el fármaco en función del tiempo (control temporal), localizada (control espacial) y, cuando es posible, la administración del agente activo se lleva a cabo de una manera vectorizada, hacia un tejido o entorno de células específico.(19-20)

En la Fig.5 se muestra el comportamiento de Concentración plasmática (C_p) vs tiempo (t) de diferentes tipos de sistemas de liberación.

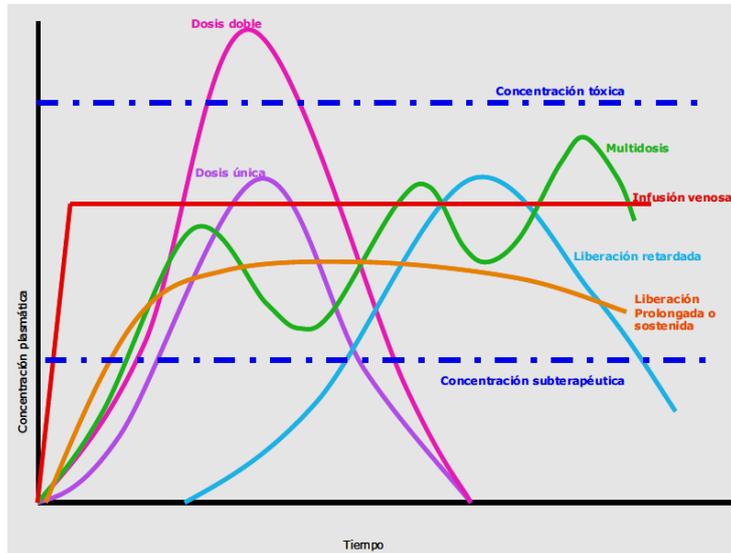


Figura 5. Curvas típicas de plasma resultantes del empleo de diferentes sistemas de liberación modificada(21).

En los sistemas de liberación controlada (Tabla 1), el fármaco es incorporado a un soporte que generalmente es un material polimérico o una combinación de varios. La velocidad de liberación de la sustancia activa, desde dicho sistema al medio que la rodea, viene determinada por las propiedades del propio polímero, su interacción con el fármaco y en menor medida de los factores ambientales, como pueden ser el pH, la temperatura y los fluidos del organismo. (22)

Al incluir un principio activo en un sistema de liberación controlada se mejora su eficacia terapéutica y se aumenta su estabilidad, a la vez que se reducen los efectos secundarios y los trastornos al paciente. Con este tipo de sistemas se trata de alcanzar una cinética de orden cero y no suelen existir cambios en la concentración del fármaco en el organismo a comparación de los cambios intermitentes de concentración en las dosificaciones convencionales. Su utilización permite la administración de medicamentos desarrollados, utilizando biotecnología, como péptidos y proteínas; y permiten una gran variedad de rutas de administración (oral, parenteral, transdermal, nasal, ocular, etc.). (22)

En aquellos casos en los que la actividad de los fármacos convencionales se pierde o se ve disminuida en el medio corporal, la combinación con macromoléculas puede mejorar la eficacia de estos fármacos, aliviando la respuesta inmunológica del paciente y reduciendo la inactivación biológica del agente terapéutico.(22)

Tabla 1. Problemas y necesidades de los sistemas de liberación.

SISTEMA	PROBLEMAS	NECESIDADES
Oral	La velocidad de liberación del fármaco no presenta necesariamente una absorción igual de esté .	Que ejerza control del tránsito gastrointestinal.
Ocular	Incompatibilidad del organismo con un cuerpo extraño.	Que sea fácilmente aplicable. Sistemas de larga duración.
Implantes	Erosionables. Las velocidades de erosión y liberación no son siempre reproducibles.	Que ofrezca información química y biológica del implante, velocidad de erosión y compatibilidad.
Transdermal	Velocidad de transporte inadecuada (efectos de acumulación).Incompatibilidad (irritación)	Acción intensificadora.

Los sistemas basados en materiales poliméricos diseñados para aplicaciones médicas tienen en cuenta una serie de factores tales como: la naturaleza de la enfermedad, las propiedades del fármaco, el tipo de terapia (puntual o crónica), la fisiología del paciente, la ruta de administración, la localización de la terapia, y las características del material polimérico empleado, incluyendo el mecanismo de liberación del fármaco. (12, 22)

Los materiales poliméricos empleados en medicina incluyen polímeros sintéticos que imitan polímeros naturales con modificaciones químicas. Estas modificaciones se hacen para mejorar la biocompatibilidad, degradabilidad, o para introducir otras propiedades deseadas. También se suelen conjugar químicamente con los fármacos modificando eficazmente las características bioquímicas y farmacológicas del principio activo. La permeabilidad de los materiales poliméricos puede ser modificada y controlada, se les puede dar forma fácilmente y pueden ser empleados de forma relativamente sencilla con una gran variedad de métodos.

Los ingredientes activos y los modificadores de propiedades pueden ser incorporados tanto física como químicamente. En general, los polímeros tienen muy baja o ninguna toxicidad.

A la fecha se han diseñado sistemas de liberación modificada que logran una selectividad farmacológica no solo por la estructura química sino también por controlar la frecuencia de liberación; estas formas de dosificación se clasifican según la FDA de la siguiente manera:

a.- Formas de dosificación retardada.

Son aquellas en las que el principio activo se libera de forma desplazada en el tiempo, pero no se consigue prolongar el efecto terapéutico.

b.- Formas de liberación controlada.

Formas de liberación continua. Son las ideales por que mantienen la concentración plasmática constante durante un tiempo mayor que las convencionales.

c.- Formas de liberación prolongada. Unas de las más utilizadas; inicialmente liberan una cantidad de fármaco similar a una dosis habitual simple, posteriormente ceden gradualmente el resto del principio activo durante un largo espacio de tiempo.

d.- Formas de liberación repetida. Son aquellas que liberan dosis del principio activo a intervalos regulares o no y a dosis similares.

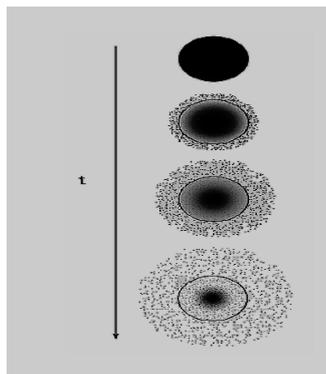


Figura 6. Representación esquemática de un sistema matricial de liberación.

A continuación se exponen algunos de los diferentes sistemas novedosos de liberación que hay en la actualidad y son los siguientes:

a.- Sistemas de liberación controlada a través de membranas.

Los sistemas están constituidos por un núcleo central del fármaco a modo de reservorio, rodeado por una membrana polimérica, que controla la liberación del principio activo. La liberación puede realizarse por difusión, humectación y/o por erosión de la misma. Dentro de este grupo se pueden incluir algunos tipos de implantes. Estos consisten en un dispositivo polimérico portador del fármaco que se implanta en el tejido subcutáneo o distintas cavidades corporales. Entre los materiales empleados se encuentran macromoléculas formadoras de hidrogeles, siliconas, polietilenos, copolímeros de etileno y acetato de vinilo (EVA) y polímeros biodegradables.

Dicha liberación del principio activo se realiza a velocidad fija (Fig. 7), una vez establecido un flujo sanguíneo. Los niveles hemáticos constantes se logran por el desnivel de concentración existente entre el reservorio del fármaco y el torrente sanguíneo. Este desnivel se alcanza al encontrarse en exceso el principio activo contenido en el reservorio.

b.- Sistemas matriciales.

Son aquellos destinados a prolongar y controlar la liberación constituida por dispersiones moleculares o de partículas uniformes de un principio activo en un soporte (Fig.6), generalmente de tipo polimérico. Uno de los principales inconvenientes de estos sistemas es su liberación no lineal, lo cual disminuye la velocidad de cesión debido al aumento progresivo de la difusión(19, 23)

c.- Sistemas mixtos

Son aquellos en los cuales se combinan la constante cinética de los sistemas de liberación a través de membrana con la mecánica de los sistemas matriciales de difusión controlada. Un ejemplo de este sistema híbrido son los sistemas terapéuticos transdermales (Catapres-TTS and Transderm-Scop)(24)

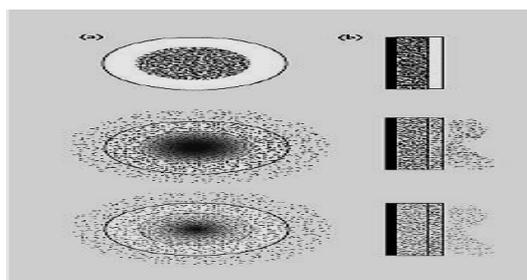


Figura 7. Liberación de fármacos desde sistemas tipo reservorio, (a) implantes o sistemas orales y (b) sistemas a través de la piel.

A continuación en la Tabla 2 se enuncian algunas ventajas e inconvenientes de los sistemas en mención, sistemas de liberación.(22, 25-27)

Tabla 2. Ventajas y Desventajas de los Sistemas de Liberación Controlada.

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Capaz de liberar al fármaco de manera controlada en el tiempo y de manera dirigida a un sitio específico del organismo.	Pueden causar pronta liberación de toda la carga del activo, cantidades pensadas para periodos largos y por ende, tóxicas si son liberadas prematuramente.
Mantiene niveles plasmáticos semejantes a los logrados con una infusión intravenosa continúa y durante un período de tiempo más largo.	Imposibilidad de retirar el sistema en caso de efectos adversos, aunque no todos cumplen con tal comportamiento.
Pueden incrementar la eficiencia de los fármacos lábiles.	El costo efectivo para manufactura de un SLC, es en general mayor que el de una forma farmacéutica convencional.
Permite a atravesar al fármaco ciertas barreras fisiológicas para llegar a su sitio de acción, resistiendo metabolismo y ataque químico.	Formación de productos secundarios nocivos procedentes del polímero, si éste es biodegradable.
Los fármacos lábiles, tales como los péptidos, proteínas, y enzimas, incrementan su actividad y al mismo tiempo minimizando los efectos secundarios que pudiesen causar después de su administración.	
Mezclar sustancias incompatibles	
Retener sustancias volátiles.	
Enmascarar sabor y olor.	
Convertir un líquido en un sólido.	
Mejorar las propiedades de compactación.	
Disminuir la respuesta inmune.	

3.2.1. Vectorización de fármacos

En el ámbito farmacéutico la vectorización se define, como la acción tecnológica dirigida a modular y dirigir (en el caso ideal) un principio activo en el organismo y el término vector, farmacológicamente hablando, se refiere al acarreador, la forma farmacéutica que engloba al fármaco; de tal modo que, las propiedades físico-químicas del vector (tamaño, carga, mecanismo de liberación, etc.) son las responsables de que, por ejemplo: a) las propiedades farmacocinéticas del principio activo (distribución); b) mejorar el índice terapéutico, aumentando el efecto terapéutico y/o disminuyendo los efectos indeseables y la toxicidad que provoca el principio activo; c) aumentar la vida media del principio activo protegiendo a fármacos lábiles de su inactivación; d) modular la liberación del principio activo en el tiempo; e) aumentar la inmunogenicidad de antígenos encapsulados. (23, 28)

Algunas de las ventajas que se le atribuyen a la vectorización de fármacos son la especificidad de acción y la mejora en la penetración intracelular; con la especificidad, se permite dirigir el fármaco a las células o tejido diana de modo selectivo evitando de este modo ciertos órganos y disminuyendo los efectos secundarios derivados de una distribución inespecífica. La mejora en la penetración intracelular logra un aumento en la eficacia de tratamientos que mediante las formas convencionales no alcanzan concentraciones adecuadas a este nivel.

Para poder saber cómo se comportaran los distintos acarreadores es necesario conocer algunas propiedades de los mismos: distribución, tamaño de partícula, potencial Z, hidrofobicidad de la superficie y análisis químico de la misma.(21, 29)

Para conseguir sistemas altamente eficaces se necesita que(12, 21, 29):

La superficie sea hidrofílica.

La superficie sea no activante.

La adsorción de componentes del suero sea baja.

El tamaño de partícula no importa si la superficie es la adecuada.

Todos los requerimientos deben de cumplirse simultáneamente.

Los vectores o acarreadores más utilizados se pueden clasificar en tres grupos:

Coloidales: liposomas, niosomas, micropartículas y nanopartículas

Moleculares: ciclodextrinas, anticuerpos y dendrímeros.

Celulares: eritrocitos resellados.

3.2.1.1 Sistemas moleculares.

Ciclodextrinas.

Las ciclodextrinas son una familia de oligosacáridos cíclicos de glucosa que resultan de la degradación enzimática del almidón, catalizada por la ciclomaltodextrina glucanotransferasa. Estos oligosacáridos cíclicos están constituidos por unidades de α -D-glucopiranosas unidas entre sí por enlaces α -1,4 glucosídicos.

Generalmente, en soluciones acuosas, las ciclodextrinas forman los llamados "complejos de inclusión", donde las moléculas de agua se localizan en el exterior de la ciclodextrina y la cavidad central lipofílica se encuentra ocupada por una molécula huésped lipofílica o una molécula de fármaco; existen factores que afectan la formación del complejo de inclusión, tales como el tipo de ciclodextrina, el tamaño de la cavidad, pH y el estado de ionización, así como la temperatura.

Debido a la conformación de las unidades de glucopiranosas en forma de silla, las ciclodextrinas forman un cono truncado, parecido a un cilindro. Las ciclodextrinas más comunes son las α , β y γ -ciclodextrinas, las cuales constan de 6, 7 y 8 unidades de glucopiranosas respectivamente.

Las ciclodextrinas pueden proteger al fármaco de la degradación por su efecto de camuflaje, o bien, encapsular a los substratos que van a reaccionar, disminuyendo su movilidad e impidiendo que interactúen. (12, 29)

Dendrímeros.

Son macromoléculas altamente ramificadas, globulares y bien definidas, formadas por capas, cuyas dimensiones son del orden de nanómetros y presentan un número alto de grupos funcionales en su periferia.

Las primeras síntesis de estos compuestos fueron desarrolladas entre 1979 y 1983. El método de síntesis de los dendrímeros permite un alto control de las ramas y la obtención de materiales monodispersos.

Los dendrímeros se construyen etapa por etapa mediante la repetición de una secuencia de reacciones que permiten la multiplicación del número de unidades repetitivas y funciones terminales, existiendo dos metodologías básicas: divergente y convergente. Algo similar a lo que se muestra en siguientes esquema.

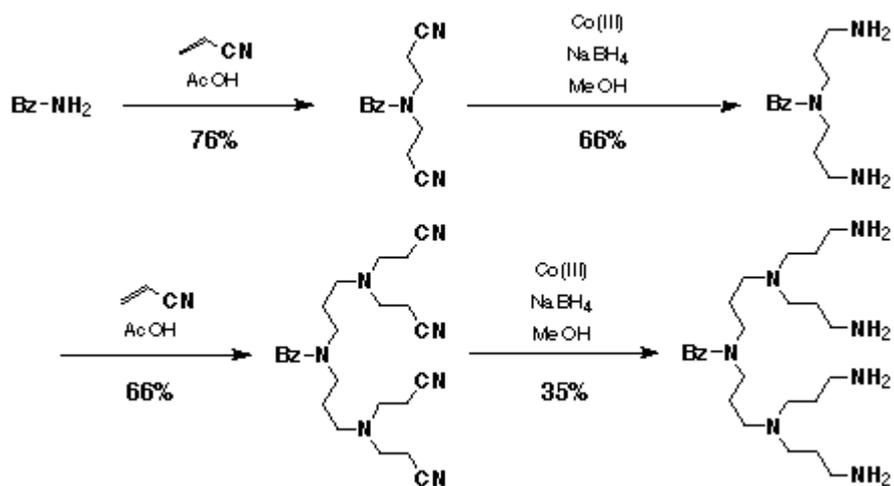


Figura 8. Imagen obtenida de internet (<http://www.ninger.com/dendrimer/one.htm>)

El método divergente empieza la construcción a partir del núcleo al cual se le unen un número dado de ramas. En la siguiente etapa, se funcionalizan los extremos de las ramas para posibilitar su crecimiento. Se unen nuevas ramas cuyos extremos se unen y así se continúa progresivamente hasta la generación deseada.

Mientras que en el método divergente se hace crecer el dendrímero desde dentro hacia fuera, en el método convergente el dendrímero crece desde fuera hacia dentro. A continuación en la figura 9 se observa el diseño de un dendrímero en su forma más habitual o común.

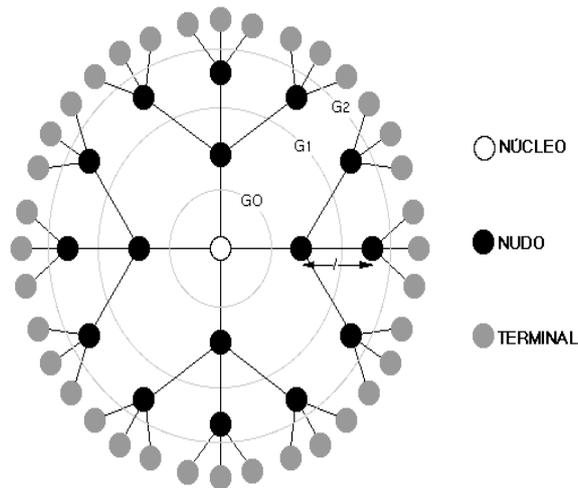


Figura 9. Dendrímero típico

Principalmente los dendrímeros se estudiaron como acarreadores de fármacos usándolos como micelas convencionales unimoleculares (núcleo hidrofóbico y periferia hidrofílica) solubles en agua, micelas inversas unimoleculares (núcleo hidrofílico y periferia hidrofóbica) o cajas dendríticas para la encapsulación no covalente de fármacos. Tiempo después, como alternativa para el desarrollo de anticancerígenos, se aprovechó la definida multivalencia de los dendrímeros para la unión covalente de éstos fármacos en la periferia del dendrímero. Debido a lo anteriormente señalado, se puede decir que los dendrímeros pueden ser utilizados como acarreadores de fármacos de dos maneras:

.- Las moléculas de fármaco pueden estar atrapadas físicamente dentro de la estructura dendrítica.

.- Las moléculas de fármaco pueden estar unidas covalentemente en la superficie o en otros sitios del dendrímero, formando conjugados fármaco-dendrímero.

Actualmente se usan dendrímeros PAMAM (poliamidoamina) (Fig 10.), poli (propilenimina) con diaminobutano (DAB) o diaminoetano (DAE) como núcleo y PEO (polióxido de etileno) injertado con carboxilano (Csi-PEO) para su estudio sistemático in vitro. (12, 30-31)

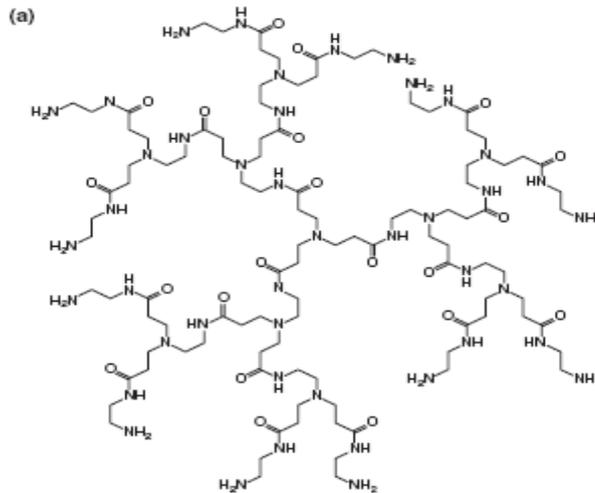


Figura 10. Dendrímery PAMAM

Anticuerpos.

Los anticuerpos se pueden utilizar como sistemas acarreadores siempre y cuando el fármaco se una a éste, esto lo pueden hacer de dos formas, covalentemente o no covalente. Si la unión es de forma covalente, entonces habrá una pérdida o disminución de actividad; así como problemas de paso de membrana, por lo que se desea evitar este tipo de uniones y tener uniones que presenten menor fuerza de unión. El uso de este tipo de moléculas como acarreadores favorece que la mayor cantidad del fármaco se encuentre en el sitio de acción y en menor concentración a nivel sistémico.

Los anticuerpos que se utilicen como acarreadores deben de ser altamente específicos poseer gran afinidad para unirse con las células correspondientes y ser fáciles de preparar. (12, 29)

3.2.1.2. Sistemas Celulares.

Eritrocitos.

Los eritrocitos o células rojas constituyen la población más grande de las células sanguíneas, éstas transportan oxígeno a todos los tejidos del cuerpo. Los eritrocitos tienen una vida de aproximadamente 120 ± 20 días, y cuando envejecen son destruidos por el bazo.

Estas células se pueden utilizar como acarreadores, debido a su capacidad para ser abiertos y resellados con el fin de poder introducir moléculas en su interior, sin

que sufran variaciones en su estructura. Durante los años 70 diversos estudios se enfocaron en la encapsulación de fármacos y proteínas; subsecuentemente a la encapsulación de enzimas y péptidos con actividad terapéutica. La liberación del fármaco en este tipo de acarreadores se lleva a cabo por medio de solubilidad lipídica y por difusión facilitada o transporte activo.

Desde una perspectiva terapéutica, los eritrocitos han sido empleados con dos objetivos principales:

Actuar como reservorios de fármacos, liberándolo de forma prolongada dentro del cuerpo, con lo cual se logra modificar la posología del fármaco, así como los intervalos de dosificación.

Dirigir al fármaco específicamente al sistema fagocítico mononuclear para que lleguen al hígado, bazo y médula ósea, que son los sitios donde se lleva a cabo la destrucción de los eritrocitos.

En el siguiente cuadro se mencionan las ventajas y desventajas del uso de este tipo de acarreadores(12, 29, 32):

Tabla 3. Eritrocitos Empleados como Acarreadores. Ventajas y Desventajas.

Ventajas.	Desventajas.
Su alta biocompatibilidad, comparada con la de otros acarreadores, puede ser optimizada utilizando eritrocitos autólogos; es decir eritrocitos que se toman del mismo paciente.	Al igual que los acarreadores hechos con materiales biodegradables, estos son eliminados fácilmente por el sistema fagocítico mononuclear, lo cual puede provocar efectos tóxicos en el paciente por una liberación masiva del fármaco.
La cantidad de fármaco encapsulada puede ser muy grande, utilizando poca cantidad de células.	Debido a que estos acarreadores son de origen biológico, los procesos de encapsulación pueden tener una gran variabilidad.
El fármaco tarda en eliminarse el mismo tiempo que tarda en eliminarse el eritrocito, por lo que se puede mantener una liberación prolongada.	La formulación de los eritrocitos cargados puede ser un futuro problema, ya que las condiciones de almacenamiento no tienen que afectar su viabilidad.
Los eritrocitos pueden ser utilizados como reservorios de fármacos, permitiendo una liberación sostenida dentro de la circulación.	Se requieren controles sanitarios rigurosos a la hora de la recolección y almacenamiento de los eritrocitos.

3.2.1.3. Sistemas coloidales.

Son todos aquellos constituidos por partículas menores a 1µm, entre los más mencionados en la liberación modificada se encuentran los liposomas, niosomas, nanopartículas y micropartículas.

Liposomas.

Los liposomas son vesículas de membranas concéntricas formados por una o múltiples bicapas fosfolípicas, y que encierran un volumen acuoso en su interior. Los componentes más importantes son los fosfolípidos, y de éstos los más comunes las fosfatidilcolinas, también conocidas como lecitinas.

Además de fosfolípidos, otros compuestos pueden formar parte de la estructura de los liposomas, como es el caso del colesterol, el cual reduce la capacidad de movimiento de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos confiriendo rigidez a las vesículas, lo que influye principalmente en su permeabilidad; otros compuestos que pueden incluirse en la composición lipídica de los liposomas, son moléculas que aporten cargas a la estructura o vesículas con el fin de evitar la agregación de estas, tales como son el dipalmitoil-fosfatidil-glicerol, el diacetilfosfato, que confieren carga negativa, o la estearilamina, que confiere carga positiva a las vesículas.

La composición del liposoma le confiere cierto grado de fluidez que depende del grado de empaquetamiento de los lípidos, lo cual está influenciado por la temperatura de transición T_g de éstos. Según el número de bicapas lipídicas los liposomas se definen como vesículas unilaminares, grandes o pequeñas, o multilamelares, y se conocen como “large unilamellar vesicles”(LUVs), “small unilamellar vesicles” (SUVs), y multilamellar vesicles (MLVs), respectivamente.

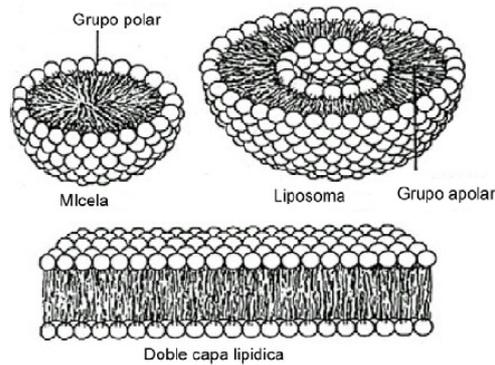


Figura 11. Estructura de liposomas.

Preparación de liposomas.

Existen diversas técnicas para la preparación de liposomas que permiten obtener vesículas de distinto tamaño, volumen interno y capacidad de encapsulación. A continuación se describen algunos de los principales métodos:

.- Método de hidratación: Tras disolver los fosfolípidos y el resto de los componentes de la membrana en un disolvente orgánico volátil (cloroformo), se efectúa su evaporación a presión reducida para lograr la formación de una fina película sobre las paredes del recipiente de evaporación. La rehidratación de la película con una solución acuosa lleva a la formación de liposomas normalmente tipo MLV.

.- Método de inyección rápida en etanol o éter: Los fosfolípidos disueltos en etanol o éter se inyectan a gran velocidad con ayuda de una jeringa sobre un gran volumen de fase acuosa. Se forman espontáneamente liposomas tipo SUV.

.- Método de eliminación del detergente: La formación de liposomas unilamelares SUV se produce tras eliminar el detergente de una suspensión previamente preparada de micelas mixtas detergente/fosfolípidos.

.- Método de evaporación en fase reversa: La adición de un pequeño volumen de fase acuosa sobre la solución orgánica con los fosfolípidos (relación 1:3) y posterior sonicación produce la formación de una emulsión. La eliminación de la fase orgánica a presión reducida induce la formación de liposomas a través de un estadio de gel intermedio. Esta técnica lleva a la obtención de liposomas LUV.(12, 21, 23, 28-29, 33)

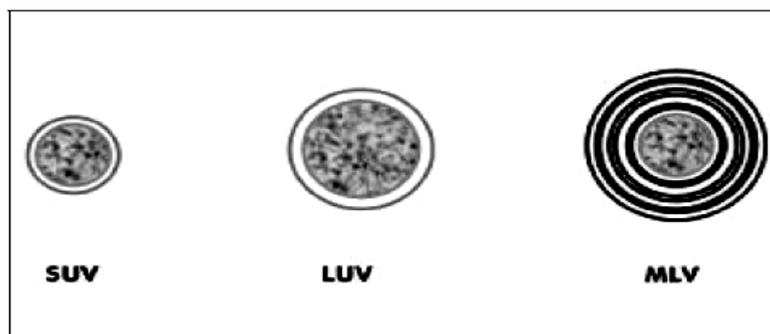


Figura 12. Tipos de liposomas. El relleno en negrita representa espacio interno acuoso y los círculos concéntricos las bicapas lipídicas.

Niosomas.

Son vesículas formadas por tensoactivos no iónicos y presentan una mayor estabilidad que los liposomas. Para conferirle mayor estabilidad se incluyen en su estructura otros tensoactivos cargados y un porcentaje de colesterol.

Su eficacia de carga depende del método de preparación y de la composición de la bicapa, (a más colesterol, mayor longitud de cadena y mayor carga, mayor atrapamiento). (12, 21, 29)

Micropartículas.

Las micropartículas pueden definirse como partículas esféricas de origen polimérico cuyo tamaño se encuentra en el rango del micrómetro (1-250 μm). Existen dos tipos de micropartículas: las microesferas en las que el fármaco está disperso o disuelto en una matriz polimérica sólida y las microcápsulas cuando el fármaco se encuentra en una fase líquida interior y rodeada por una membrana polimérica. Son preparadas a partir de diversos materiales y sus características físicas dependerán del uso al que estén destinadas. Una desventaja que se presenta con esta forma farmacéutica, es que debido a su tamaño existe el riesgo de activación del sistema inmunitario y la posibilidad de producir toxicidad.

Métodos de preparación.

Los procedimientos de fabricación de micropartículas se pueden clasificar en tres grandes grupos: físico-químicos, químicos y mecánicos. La selección de un procedimiento de fabricación de micropartículas depende de las propiedades físicas y químicas de la pareja principio activo / polímero, y de las características

finales de las micropartículas a preparar (granulometría, estructura interna, concentración del principio activo, perfil de liberación, humectabilidad, etc.), en función, principalmente, de la vía de administración elegida.

Los métodos de preparación más utilizados son la "evaporación del disolvente" y el denominado "spray-drying". Generalmente, y como paso común para estos métodos, el fármaco a encapsular disuelto en solución acuosa o como polvo seco, se dispersa en la solución orgánica que contiene el polímero (inmiscible con la fase acuosa), mediante un homogeneizador o sonicador. De esta manera se forma o bien una emulsión del tipo acuo-oleosa (W/O) o bien el fármaco queda disperso en la solución polimérica. En el primero de los métodos, evaporación del disolvente, la fase orgánica o la emulsión se vierte sobre una fase acuosa con tensoactivo y tras agitación continua que permite la evaporación del disolvente se obtienen las micropartículas.

En el segundo método, "spray-drying", ventajoso para la producción a gran escala, se nebuliza la solución polimérica o la emulsión bajo una corriente de aire caliente que permite la evaporación del disolvente y la formación de las partículas instantáneamente. (21, 25, 28-29, 34)

Nanopartículas.

Las nanopartículas son partículas sólidas coloidales, cuyo tamaño de partícula oscila entre 1 nm y 1000nm; están formadas por materiales macromoleculares en donde el principio activo se disuelve, encapsula o se une de distintas formas. Dependiendo del método de elaboración pueden ser nanocápsulas o nanoesferas.

En un comienzo para la elaboración de nanopartículas, como medios de dosificación de fármacos, se utilizaban polímeros no biodegradables (poliacrilamida y polimetilmetacrilato), pero este tipo de polímeros retarda la liberación del fármaco e imposibilita su administración en humanos por riesgo de una acumulación tóxica del material empleado a nivel intracelular, por ello actualmente se están utilizando polímeros biodegradables.

Entre los materiales biodegradables (ver Fig. 13) utilizados se puede distinguir los sintéticos, como polialquilcianoacrilatos, poliésteres (copolímeros del ácido láctico y glicólico, poli(e-caprolactona), los derivados de macromoléculas naturales tipo

protéico (gelatina, albúmina y colágeno), y los polisacáridos (ácido hialurónico, ácido algínico y quitosán).

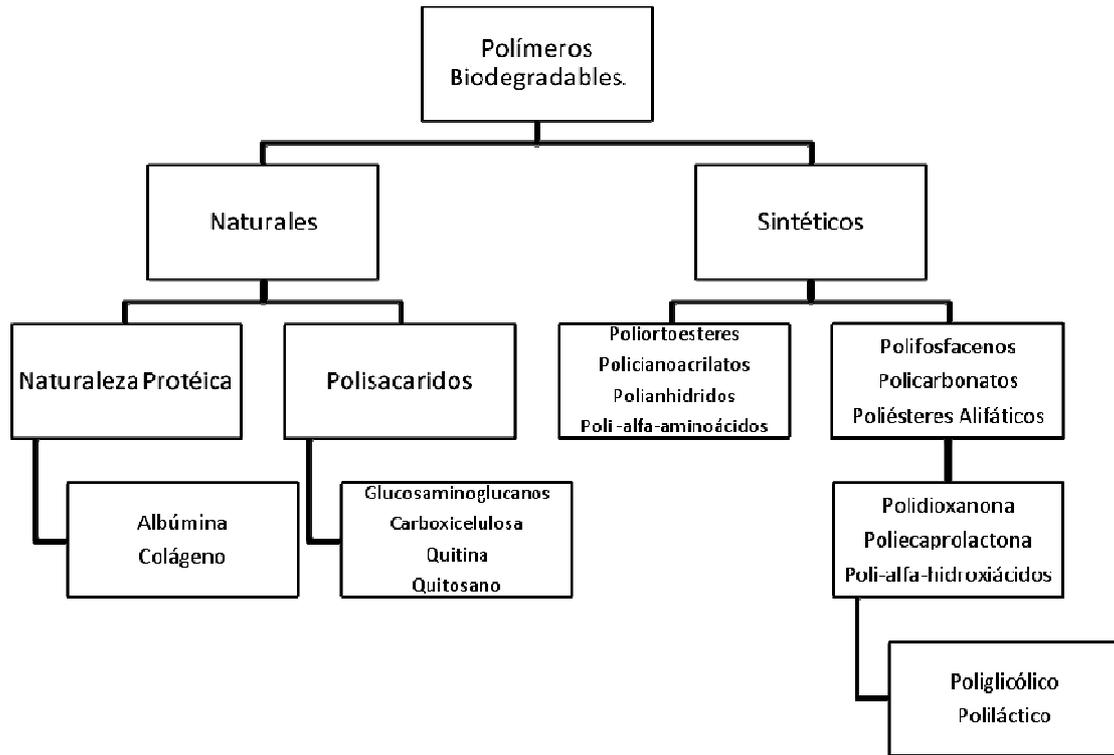


Figura 13. Polímeros biodegradables utilizados en aplicaciones biomédicas.

Es importante mencionar que la elección del tipo de polímero es de vital importancia, dado que de éste dependerá la permeabilidad de los medicamentos a través de su estructura polimérica, porque según la estructura química del polímero se verá afectada su solubilidad, cristalinidad y capacidad de hinchamiento. El tamaño y el método de preparación, dependerán de la bioaceptación de éste; así como también de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y de la meta terapéutica.

Métodos de Preparación de nanopartículas.

Los métodos de preparación se pueden dividir en aquellos en los que se parte del polímero previamente sintetizado o lo que se parte de los monómeros.

Polímeros previamente sintetizados

.- Emulsificación-evaporación.

El polímero y el fármaco se disuelven en un medio orgánico inmiscible con el agua y se adiciona a una disolución acuosa mediante agitación acuosa u otro mecanismo que lleve a disminuir el tamaño del glóbulo de la preemulsión formada. Se elimina el disolvente orgánico mediante vacío, calor o ambos. El resultado es la formación de una dispersión de nanoesferas.

.- Emulsificación-difusión.

Se disuelve el polímero en un disolvente parcialmente miscible en agua, el cual ha sido previamente saturado en agua.

Se adiciona la fase anterior a una disolución acuosa que contiene un estabilizante.

Se adiciona más agua, lo que hace que haya un proceso de difusión y se formen las nanopartículas y finalmente se elimina el disolvente mediante vacío.

.- Desplazamiento del disolvente.

Se disuelve el fármaco, el polímero y en ocasiones, un estabilizador en un medio semipolar, miscible con el agua.

Se adiciona la mezcla a una disolución acuosa con un estabilizante (alcohol polivinílico) manteniendo agitación

Las nanopartículas se forman inmediatamente debido a una rápida difusión del disolvente no acuoso, el cual es eliminado mediante vacío.

.- Salting-out.

Se basa en la separación de un disolvente miscible con agua en una disolución acuosa mediante efecto de saltin out.

El polímero y el fármaco son disueltos en acetona (ya que se conoce muy bien su comportamiento).

Mediante agitación es emulsificada en un gel acuoso, que contiene los electrolitos y un estabilizante coloidal. Se adiciona la suficiente cantidad de agua para que aumente la difusión de acetona a la fase acuosa y se formen las nanoesferas. Finalmente se elimina el disolvente.

A partir de monómeros

.- Polimerización en emulsión.

Se disuelve el monómero en un no-disolvente con la ayuda de un tensoactivo.

Se inicia la reacción de polimerización.

Precipitación de las nanopartículas.

.- Polimerización en fase acuosa continúa.

Se disuelve el monómero en una disolución acuosa, con o sin estabilizantes, en la que también está disuelto el fármaco.

Se inicia la polimerización mediante radiación o iniciación química.

Debido a que el polímero es insoluble en el medio hay una precipitación y formación de las nanopartículas.

.- Polimerización interfacial.

Se disuelven el fármaco y monómero en la fase en que son solubles.

Se adiciona la fase orgánica u acuosa, según sea el caso, con agitación. (En caso de ser necesario, la fase externa deberá tener un iniciador de la polimerización).

Si el proceso de polimerización es muy rápido, se forma una capa impermeable del polímero, dando como resultado microcápsulas.

La industria farmacéutica está así mismo interesada en el desarrollo de estos sistemas por razones comerciales, ya que su uso permite repatentar fármacos cuya eficacia terapéutica está comprobada. Además de ser otra forma de sistemas de liberación de fármacos que nos permite mantener el efecto terapéutico, durante más tiempo; también nos puede brindar un mayor alcance de órganos blanco, lo que da como resultado el obtener una mejor efectividad del principio activo administrado.(23, 28-29, 33, 35-37)

Caracterización de las Nanopartículas.

La caracterización de las nanopartículas para conocer su estructura interna, se lleva a cabo por medio de difracción de rayos X de polvos y métodos termoanalíticos., tales como la calorimetría diferencial de barrido (DSC), análisis térmico diferencial (DTA), análisis termogravimétrico (TGA), análisis termomecánico (TMA) y análisis óptico térmico (TOA).

Algunos parámetros que deben de tomarse en cuenta y que influyen en el comportamiento del sistema son; el tamaño de partícula, la estabilidad de las nanopartículas (potencial zeta), que en algunos casos afecta a la liberación de un fármaco o degradación de éste; la carga superficial, la hidrofilia y la lipofilia, dado

que dichos parámetros son los que se encontraran expuestos a un medio externo y se verán modificados por él.

.- Tamaño de partícula.

Algunas de las técnicas más usadas para la medición de tamaño de partícula son, espectrofotometría de correlación fotónica (PCS) y difracción de rayos laser (LD). La PCS es también conocida como dispersión de luz dinámica (DLS, dynamic light scattering), ésta se basa en la medición de la fluctuación de la intensidad de la luz esparcida, causada por el movimiento aleatorio de las partículas, mejor conocido como movimiento browniano; por tal razón la viscosidad del medio es un factor importante a considerar. Del mismo modo un factor importante es el material del que están hechas las nanopartículas, dado que éste influirá en el cálculo de los factores requeridos para la teoría Mie; la cual es utilizada para mejorar la precisión en la medición.(36, 38)

.- Potencial Zeta (ζ)

El potencial Zeta es un parámetro que nos permite realizar predicciones acerca del comportamiento de las dispersiones coloidales; es decir si en la superficie de los coloides se encuentra una carga, la cual puede ser positiva o negativa, y ésta es lo suficientemente alta, se producen fuerzas electrostáticas de repulsión; lo cual mantendrá los coloides dispersos y en el caso contrario; si la repulsión es baja, entonces los coloides se aglomerarán y habrá presencia de sedimento. El entorno de los coloides se puede modificar y dicha alteración es medible gracias al potencial zeta y esto afecta la estabilidad del sistema.(12, 21, 38-39)

.- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC)

El DSC es una técnica que nos permite analizar las transiciones térmicas de un polímero mediante la medición en la diferencia de la energía suministrada a una referencia con respecto al requerido por la muestra; estableciendo una misma velocidad de calentamiento para ambos casos; es decir la diferencia en la capacidad calorífica (C_p) requerida para éstos (referencia y muestra). Las transiciones térmicas que se pueden observar y por ende nos permiten identificar a un polímero; así como también nos permiten conocer la pureza de éste, son la temperatura de transición vítrea, temperatura de cristalización y la temperatura de

fusión. A continuación se muestra un esquema de los eventos térmicos, endotérmicos y exotérmicos que se pueden medir con el DSC(12, 21, 40):

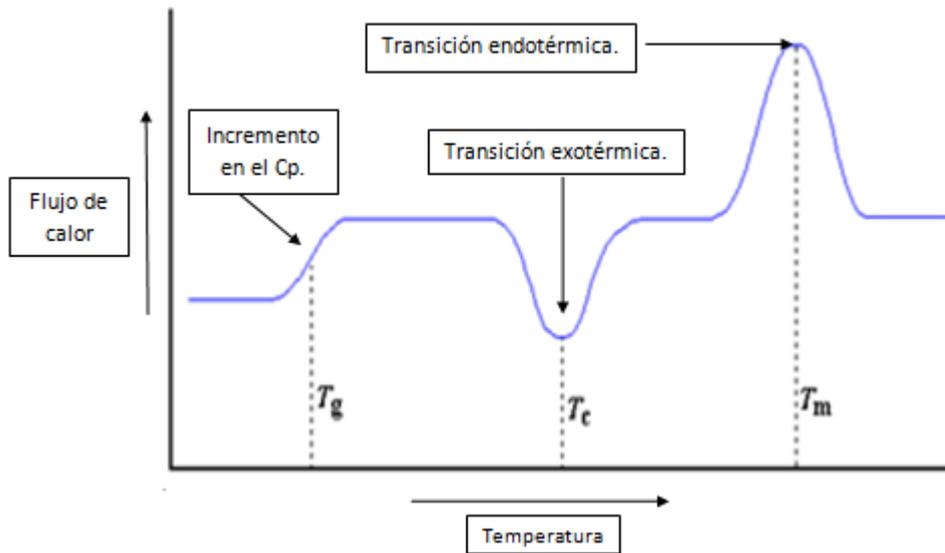


Figura 14. Ejemplificación de un Termograma.

3.2.2. Modificación en superficie

Los sistemas micro y nanoparticulados son considerados como buenos sistemas acarreadores de fármacos; sin embargo dentro del organismo deben superar al Sistema Fagocítico Nuclear o Sistema Reticuloendotelial para lograr una estancia prolongada; ya que las partículas son fácilmente eliminadas, sobre todo las que contienen una superficie hidrofóbica.

Para lograr una mayor estancia dentro del organismo se requiere modificar la superficie de las nanopartículas; para lo cual se utiliza comúnmente polisacáridos como son el dextran, chitosan y heparina; aunque una muy buena alternativa para recubrir nanopartículas son los polímeros como la polivinilpirrolidona (PVP), alcohol polivinílico (PVA), la poliacrilamida, y especialmente el polietilenglicol (PEG).(12)

3.3. LIBERACIÓN MODIFICADA DE IVERMECTINA

Hoy en día se le está dando una vital importancia en la industria veterinaria a la tecnología de los sistemas de liberación controlada, con el principal objetivo de prevenir efectos adversos o enfermedades causadas por la liberación de agentes antiparasitarios, insecticidas, ixodicidas y antimicrobianos. Además de prevenir los

efectos adversos en el animal, también se busca la manera de evitar que el medicamento llegue al ser humano y de que dicho fármaco; después de ser metabolizado por el animal dañe el medio ambiente, ya sea directa o indirectamente.

Dado los beneficios que trae consigo la liberación modificada, actualmente existen gran cantidad de formas farmacéuticas en las cuales se dosifican fármacos como; antibióticos, agentes antiparasitarios, insecticidas, ixodicidas, hormonas para la sincronización del estro, esteroides para el control de la fertilidad y promotores del crecimiento.

Entre estas formas farmacéuticas se encuentran:

- .- Sistemas subcutáneos implantables.
- .- Sistemas implantables veterinarios terapéuticos que pueden liberar al fármaco en patrones pulsátiles de orden cero.
- .- Microesferas y microcapsulas para inyección directa de un fármaco en el sitio de acción.
- .- Formulaciones inyectables de liberación controlada a base de aceites.
- .- Formulaciones "spot on" (pequeño volumen) en base oleosa que son añadidas directamente a la piel y pueden liberar el fármaco durante un mes.
- .- Etiquetas de oreja y collares para el control de moscas u otros ectoparásitos en el ganado vacuno y animales domésticos respectivamente. Los agentes activos son liberados durante varios meses y se encuentran disponibles en la superficie total del animal.
- .- Insertos oftálmicos
- .- Dispositivos tópicos que se aplican directamente en la mucosa bucal.

Entre los dispositivos orales se encuentran, los bolos intrarrumiales como Spanbolet® II el cual es un ejemplo de este tipo de dispositivo y que está disponible para liberación controlada. Otros dispositivos orales, actualmente usados son los sistemas terapéuticos rúmiales, estos están basados en la liberación del fármaco por medio de una diferencia significativa de presión osmótica, de tal manera que por dicha variación de presiones se ve modificada la velocidad de liberación del fármaco; este sistema provee la liberación del fármaco

por poco más de un año en el rumen de las vacas y borregos. Algunos productos que están en el mercado son, Paractect Flex® Bolus, Rumensin ABC®, Spanbolet®II y Penacur SR®. (1, 10, 12, 17-18, 27)

Recientemente se han incorporado en el mercado medicamentos de liberación modificada como IVOMECC® GOLD, de Merial México, el cual es una solución inyectable con fórmula tixotrópica y presenta una duración de 75 días de actividad después de su administración. También se encuentra en el mercado VIRBAMEC PLATINUM®, de Virbac, la cual también tiene una formulación tixotrópica, inyectable de larga duración (más de 70 días).(16)

Además, en la bibliografía aparecen diferentes métodos para lograr dispositivos o preparados de larga acción, entre éstos se encuentran estudios para diferentes vías de administración, desde vía oral(41) e intraruminal(42-43) hasta formulaciones parenterales. También se han desarrollado matrices poliméricas basadas en distintos materiales como silicona(44).

IV. Objetivos

4.1. OBJETIVO GENERAL

Elaboración de nanopartículas de poli ϵ -caprolactona (PCL) e Ivermectina y estudio de su efectividad sobre larvas de garrapatas ***Bophillus Microplus***.

Realización de perfiles de toxicidad para los componentes de las nanopartículas elaboradas; así como también de los componentes de nanaopartículas elaboradas con Ácido polilactico (PLA) las cuales están compuestas por Pluronic, Aceite de ricino e Ivermectina.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Aplicar la técnica de microemulsión por fusión para la obtención de nanopartículas poliméricas.
- Caracterizar las nanopartículas poliméricas.
- Determinar la efectividad de las nanopartículas mediante la aplicación de las técnicas de Shaw y de Stone.
- Realizar perfiles toxicológicos de los componentes de las nanopartículas.

V. Parte experimental.

5.1. MATERIAL.

5.1.1. Reactivos.

ϵ - Policaprolactona (PCL), Polietilenglicol 6000 (PEG), isopropanol RA, NaCl y Brij® 56 fueron comprados a Sigma y usados sin ninguna purificación adicional. Ivermectina (lote 20030408) fue donada por Laboratorios Aranda. El agua destilada y desionizada se obtuvo en el equipo BARSTEAD Nanopure Diamond.

5.1.2. Material biológico.

Los ensayos en larvas de garrapatas, se realizaron con la especie Bophillus Microplus; las cuáles fueron proporcionadas por el Laboratorio de Parasitología, de La Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma México. Las larvas presentaban dos semanas de estadío, preservadas en incubación a 37°C de temperatura y con una humedad relativa de 70%.

Para el perfil toxicológico se emplearon ratones hembras ICR con un peso promedio entre 25g-30g; los cuales se compraron a HARLAN MÉXICO.

5.1.3. Instrumentos y Equipos.

Celdas de vidrio acopladas a un baño de agua con temperatura y agitación controlada. Baño circulador Haake DC10 P5. Balanza Analítica Ohaus Adventur. Sonicador Cole-Parmer 8890. Ultraturrax IKA T18 Basic. Zetasizer Marlven Instruments Modelo ZS3600. Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC-60) SHIMADZU, Termal Análisis System TA-60WS Shimadzu y la Liofilizadora marca LABCONCO, a una temperatura de liofilizado de -20°C y presión de vacío de 0.040mBar durante 63 hrs con trece minutos.

5.2. METODOLOGÍA

5.2.1. Elaboración de las nanopartículas.

Las nanopartículas fueron obtenidas por el método de *Microemulsion por fusión*, dicho método se eligió, con la finalidad de aprovechar la propiedad que presenta la Policaprolactona- ϵ (PCL), de solubilizar una cierta cantidad de ivermectina, para lo cual se funden 98 mg PCL a 70°C en una celda para microemulsiones y se agregan 9.8 mg de ivermectina. Posteriormente, se mantiene la mezcla en agitación durante 1 minuto y se agregan 2ml de una mezcla de Isopropanol-Brij56 (1:1), después de un minuto de agitación añadir 1.56 mL de la mezcla de Isopropanol-Brij56 (1:1). Esto con la finalidad de facilitar la interacción de la ivermectina con la PCL.

Una vez realizado lo anterior, se deja agitando durante 5 minutos, posteriormente se apaga el calentamiento y se continúa con la agitación. Inmediatamente después de haber quitado el calentamiento se agregan 80 mL de PEG 6000 (1.5mg/mL) a 10°C de temperatura, y se mantiene la agitación, hasta que la solución este a temperatura ambiente.

Cuando la solución está a temperatura ambiente, se procede a agitar con el ultraturrax a 10000 rpm durante 3 minutos, y se lavan las nanopartículas con la ayuda del filtro tangencial para quitar el exceso de PEG, con 3 lavados de 100 mL cada lavado; además de propiciar una mayor concentración de la cantidad de nanopartículas.

Al término del proceso anterior se procede a liofilizar los lavados, esto con la finalidad de cuantificar la cantidad de PEG que se recuperó y a esto se le puede realizar un estudio de calorimetría para verificar que en verdad se trató de este compuesto. También se liofilizan las nanopartículas con el fin de obtenerlas en condiciones secas y facilitar su almacenamiento.

5.2.2. Caracterización de las Nanopartículas.

5.2.2.1. Tamaño de Partícula y Potencial Z.

Una vez liofilizadas las nanopartículas se procede a resuspender aproximadamente 4mg de nanopartículas en 10 mL de solución de PEG 6000 (1.5mg/L), con el fin de verificar que sus características (potencial Z y tamaño de partícula) se mantienen; se sónica dicha suspensión, para homogenizar la dispersión de las partículas y se procede a medir el tamaño de partícula y el potencial zeta. Esta medición se realiza por duplicado.

5.2.2.2. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Una porción de las nanopartículas ya liofilizadas, es utilizada para llevar a cabo el análisis calorimétrico, aproximadamente 4mg \pm 0.1. Dicha cantidad de la muestra es encapsulada en crisoles de aluminio, para analizarlas en el DSC; cuyas condiciones de trabajo fueron las siguientes:

Atmósfera: Nitrógeno

Velocidad de Flujo del N₂: 30 mL/min

Celda: Aluminio

Velocidad de la Temperatura de Calentamiento: 5°C/min

Intervalo de Temperatura: 20-300°C

5.2.3. Estudios con larvas de garrapata.

Preparación de la soluciones para pruebas en larvas garrapatas.

Se realizaron cinco soluciones de cada uno de los componentes de las nanopartículas (NaCl, PEG, Isopropanol y Brij56). En todos los casos se prepararon 50.0 mL de cada una de ellas.

Se seleccionaron dos concentraciones por arriba y por debajo de la concentración presente en la formulación de las nanopartículas (las cuales se muestran en negritas); esto con el fin de dar un margen de error de más/menos el 10% de la cantidad presente en la composición.

COMPUESTO	CONCENTRACION
Brij56	14mg/ml, 16mg/ml, 18mg/ml , 20mg/ml, 22 mg/ml
Isopropanol	11 mg/ml, 13 mg/ml, 15 mg/ml , 17 mg/ml, 19 mg/ml
PEG	1.1g/L, 1.3g/L, 1.5g/L , 1.7g/L, 1.9g/L
NaCl	0.0006%, 0.0008%, 0.001% , 0.0012%, 0.0014%

Se pesaron 95 ± 0.1 mg de PEG y se colocaron en un matraz aforado de 50.0mL para tener una concentración de 1.9mg/mL el peso para las otras soluciones se muestra a continuación:

Peso	55 ± 0.1 mg	65 ± 0.1 mg	75 ± 0.1 mg	85 ± 0.1 mg
Volumen final	50.0mL	50.0mL	50.0mL	50.0mL
Concentración	1.1mg/mL	1.3mg/mL	1.5mg/mL	1.9mg/mL

Se tomó un volumen de 1.20 mL de Isopropanol y se llevó a un volumen de 50 mL y nuestra concentración final es de 19 mg/mL; el volumen requerido para las otras soluciones se muestra a continuación:

Peso	0.69 ± 0.001 mL	0.82 ± 0.001 mL	0.95 ± 0.001 mL	1 ± 0.1 mL
Volumen Final	50.0mL	50.0mL	50.0mL	50.0mL
Concentración	11mg/ml	13mg/mL	15mg/mL	17mg/mL

Se pesaron 1100 ± 0.1 mg de Brij56 y se dispersaron en 50.0mL de agua desionizada, la concentración de esta solución es de 22mg/mL. A continuación se muestran las cantidades para las demás soluciones:

Peso	700 ± 0.001 mL	800 ± 0.001 mL	900 ± 0.001 mL	1000 ± 0.1 mL
Volumen Final	50.0mL	50.0mL	50.0mL	50.0mL
Concentración	14mg/ml	16mg/mL	18mg/mL	20mg/mL

Con la PCL y la ivermectina se llevó a cabo otro proceso de preparación de soluciones; dado que estos compuestos se probaron por medio de la técnica de Stone (ver más abajo la metodología de Stone), debido a que estos compuestos presentan mala solubilidad y no era factible probarlos por el método de Shaw.

5.2.3.1. Metodología Shaw. (Prueba por triplicado)

Esta prueba se lleva a cabo en larvas de garrapata, con la finalidad de determinar la susceptibilidad a un producto acaricida; esta metodología permite determinar el

porcentaje de mortalidad de larvas con diversas concentraciones del acaricida o compuesto a analizar. Permittiéndonos realizar aproximaciones del comportamiento del principio activo *in vivo*.(6-8, 45)

De las concentraciones establecidas para la prueba, se toman 20mL y se llevan a un volumen de 100 mL con agua desionizada.

De los 100 mL preparados se toman 10 mL, los cuales se verterán en una caja Petrí a la cual previamente se le colocó un papel filtro.

En la caja Petrí se colocan una gran cantidad de larvas de garrapatas aproximadamente 5 mg de larvas.

Se les coloca encima un papel filtro de tal modo que todas las larvas queden bien sumergidas, durante 10min.

Elaborar tres parches, con papel filtro de 7.5 x 8.5 cm doblado; para colocar las larvas después de que han sido sumergidas, En cada parche se colocan aproximadamente 100 larvas y se incuban durante tres días a una humedad del 80% y a una temperatura de 30 °C.

Realizar conteo de las larvas de garrapatas.

5.2.3.2. Metodología de Stone. (Prueba por duplicado)

Esta prueba se lleva a cabo en larvas de garrapatas con fin de determinar la CL50 y se utiliza para compuestos que no son solubles.

Para realizar esta prueba se debe de conocer la pureza del compuesto para pesar 100mg de esté; si se desconoce la pureza del producto se toma por convención, como si esté presentara una pureza del 98%.(46-47)

Para la ivermectina que se utilizó se pesaron 0.0842g y se llevo a un volumen de 25mL con una mezcla de Triclorometano con Aceite de Olivo, en una proporción de 2:3. (Solución Stock)

De esta solución stock se toman 9.8 mL y se lleva a un volumen de 10 mL (Solución A)

De la solución A se toman 5 mL y se llevan a un volumen de 10 mL (Solución B)

De la solución B se toman 5 mL y se llevan a un volumen de 10 mL (Solución C)

De la solución C se toman 5 mL y se llevan a un volumen de 10 mL (Solución D)

De la solución D se toman 5 mL y se llevan a un volumen de 10 mL (Solución E)

De cada una de las soluciones preparadas anteriormente se toman 670 μL , y se colocan en un papel filtro tratando que la solución se esparza en el mayor área posible, y se deja evaporar el disolvente durante dos horas.

Con los filtros ya secos, se elaboran los parches en donde se colocaran aproximadamente 100 larvas de garrapatas y se incuban durante 24 hrs en una autoclave a 80% de humedad y 30°C de temperatura.

Realizar conteo de larvas de garrapatas.

5.2.4. Estudios toxicológicos

Preparación de las soluciones para el Perfil Toxicológico.

Las concentraciones se determinaron en base a lo estipulado en las guías de ensayos de toxicidad aguda oral de la Agencia de Protección Ambiental, EPA, por sus siglas en ingles. Environmental Protection Agency (EPA) así también se siguieron los parámetros de manejo, cantidad y condiciones de habitat de los animales, con los cuales se realizo el estudio, que se señalan en dichas guías.(48-49)

Se prepararon 6 concentraciones distintas (0.06, 0.18, 0.6, 1.8, 6, 18, 60 y 180 mg/mL) para cada uno de los compuestos (PEG, PCL, Ivermectina, Isopropanol, Brij56, Nanopartículas, y NaCl) y se prepararon 5mL de cada una de las concentraciones.

En todos los casos se pesó aproximadamente 900 ± 0.1 mg del compuesto y se llevo a 5mL en un matraz volumétrico. (Solución H) Concentración de 180mg/mL.

Se pesan 300 ± 0.1 mg del compuesto, se colocan en un matraz volumétrico y se afora a un volumen de 5 mL. (Solución G) Concentración de 60 mg/mL.

Se pesan 90 ± 0.1 mg del compuesto, se colocan en un matraz volumétrico y se afora a un volumen de 5 mL. (Solución F) Concentración de 18 mg/mL.

Se pesan 30 ± 0.1 mg del compuesto, se colocan en un matraz volumétrico y se afora a un volumen de 5 mL. (Solución E) Concentración de 6 mg/mL.

Se pesan 9 ± 0.1 mg del compuesto, se colocan en un matraz volumétrico y se afora a un volumen de 5 mL. (Solución D) Concentración de 1.8 mg/mL.

Se pesan 2.7 ± 0.1 mg del compuesto, se colocan en un matraz volumétrico y se afora a un volumen de 5 mL. (Solución C) Concentración de 0.6 mg/mL.

Se toman 166 μ L de la solución C, se colocan en un matraz volumétrico y se afora a un volumen de 5 mL. (Solución B) Concentración de 0.018 mg/mL.

Se toman 56 μ L de la solución B, se colocan en un matraz volumétrico y se afora a un volumen de 5 mL. (Solución A) Concentración de 0.06 mg/mL.

Con la PCL se llevo a cabo la elaboración de nanopartículas vacías y de estas se tomo el peso de 1.0 mL y en base a este peso se siguió el procedimiento arriba señalado.

Con la ivermectina se realizó el mismo procedimiento que se llevó a cabo con la PCL; pero en este caso no se agregó dicho polímero y se dejo sola la ivermectina.

Para el Brij56 se realizó una solución de PEG 6000 a una concentración de 1.8mg/mL, esto con el fin de facilitar la solubilidad del Brij56.

Posteriormente se aplicó la eutanasia a los ratones, por dislocación cervical, y en los animales a los cuales se les administró la mayor concentración, se les extraen los siguientes órganos: corazón, hígado, pulmón, riñón y bazo; esto con la finalidad de observar si hay daño en alguno, posteriormente se analizaran dichos órganos en el laboratorio de Histopatología en la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

VI. Resultados y Discusión.

6.1. ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS.

Las nanopartículas elaboradas se obtuvieron mediante la técnica de microemulsión por fusión, la cual consiste en formar una microemulsión donde la fase oleosa sea un polímero (en nuestro caso un polímero biodegradable, PCL) o un lípido (en el caso de nanopartículas lipídicas). La fase acuosa consta de una mezcla de agua y tensoactivo (Brij 56), el cual, a su vez, está mezclado con un cotensoactivo, que en este caso es el isopropanol.

Se elaboraron tres lotes de nanopartículas, por el método ya descrito y siguiendo la metodología ya mencionada en la parte correspondiente; a las cuales se les realizó la medición de tamaño de partícula por medio de la técnica denominada dispersión dinámica de luz, empleando el equipo Nanosizer Zen 3600; algunos de los resultados obtenidos se muestran en el siguiente gráfico. (Gráfico 1)

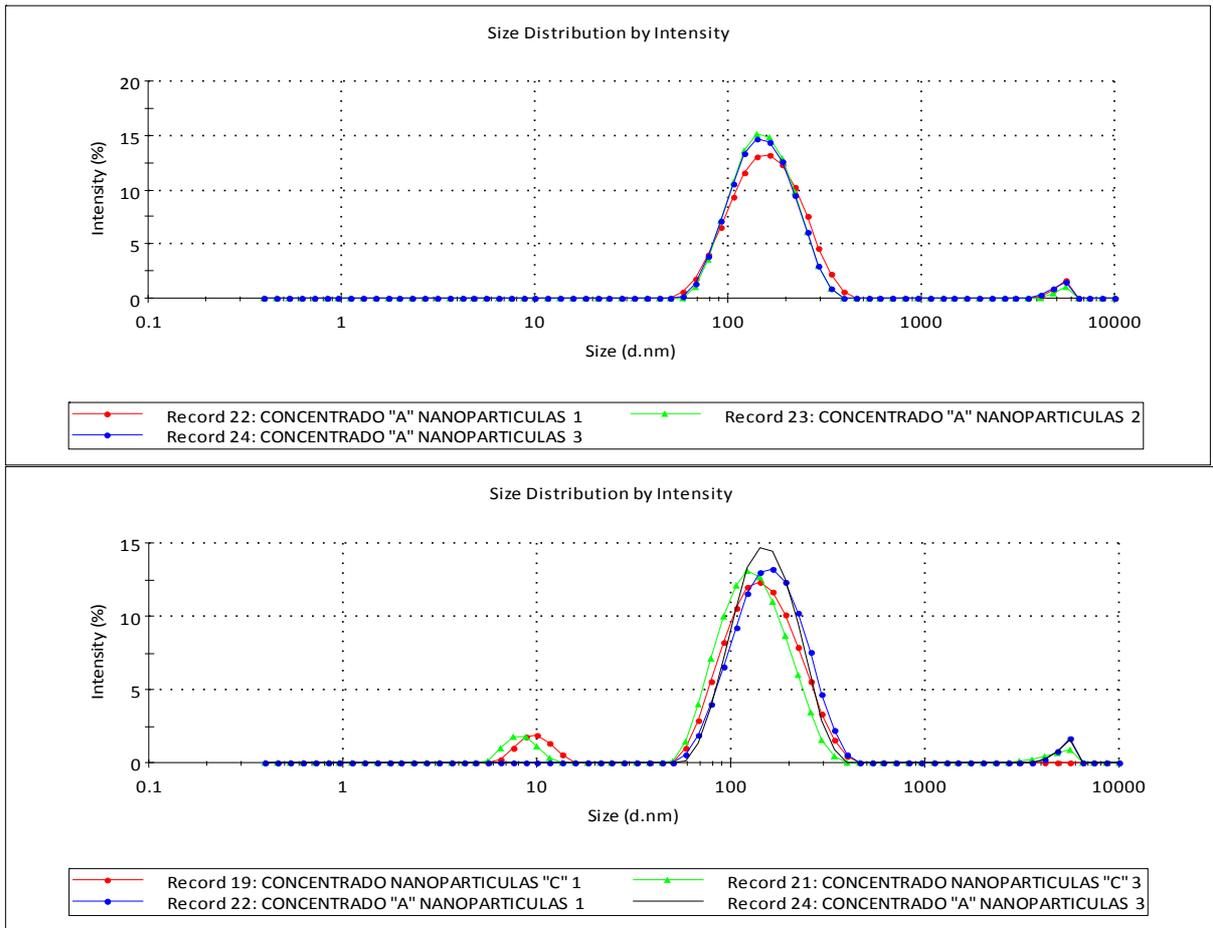


Gráfico 1. Medición de tamaño de Partícula; (grafico superior) nanopartículas de un mismo lote con un tamaño promedio de 136.5nm y $\sigma = 3.8$; (grafico inferior) dos lotes distintos, con tamaño de partícula promedio de 118.5nm y $\sigma = 21.7$.

El tamaño de partícula osciló entre 100 nm y 150 nm, y el tamaño de partícula deseado se encuentra alrededor de 200 nanómetros; lo que nos indica que estamos en el límite inferior; pero esto es lo deseable; ya que a menor tamaño de partícula, se obtiene una eliminación más lenta de las nanopartículas en la circulación, lo cual permite al fármaco un mayor tiempo de liberación y en teoría se lograría un menor tiempo de dosificación consecutiva.

Con respecto al potencial zeta en todas las muestras realizadas fue muy bajo, lo que nos indicaría que nuestras partículas presentarían una agregación muy alta, ya que en todos los lotes realizados, el potencial Z en promedio fue de -5.22 mV con una desviación estándar de 0.917; sin embargo al observar la solución de éstas no se apreciaron agregados, ni precipitados, aunque se almacenaron por un

tiempo aproximado de 24 horas. A continuación se muestran los gráficos (Gráfico 2) comparativos del potencial Z de distintos lotes.

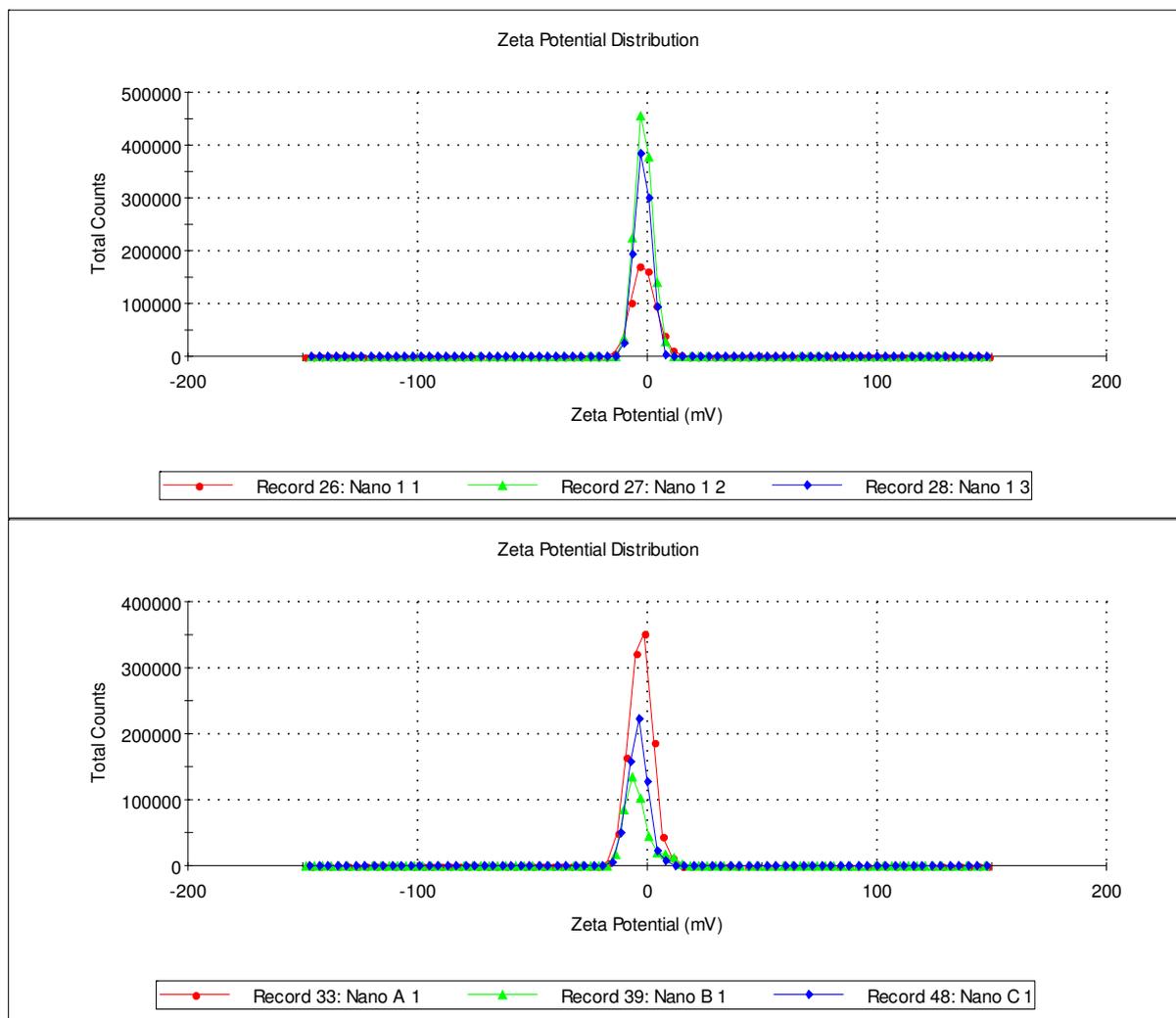


Gráfico 2. Medición de Potencial Zeta, gráfico superior muestra las nanopartículas de un mismo lote con un PZ promedio de -1.95 y $\sigma = 0.127$; gráfico inferior se muestran tres lotes distintos, con PZ promedio de -4.15 y $\sigma = 0.635$.

El comportamiento de este sistema nos revela que al contener un estabilizante (PEG 6000) se disminuye el potencial zeta, esto debido al cambio en la superficie de las nanopartículas, pero la repulsión entre éstas se mantiene, esto propiciado por las cadenas del PEG, por lo que no existe la presencia de agregados; pero ¿el PEG 6000 disminuye tanto el potencial zeta? O una gran cantidad de tensoactivo combinada con PEG es la que provoca esta disminución, ya que todas estas mediciones se realizaron antes del lavado de las partículas.

Posteriormente, se llevó a cabo el lavado de las nanopartículas con un filtro tangencial Millipore, para lo cual se utilizó un filtro PXC010C50 de la misma marca; esto se realizó con el fin de efectuar los lavados de las nanopartículas para disminuir la cantidad de Brij56 y PEG 6000, con 100mL de agua desionizada, en tres lavados; además esto nos permitió homogenizar el tamaño de partícula y concentrar nuestras partículas.

Una vez terminado todo el proceso de elaboración de las nanopartículas, procedimos a volver a medir el potencial zeta de las nanopartículas para lo cual se tomo una muestra de 4.2 mg en promedio, y ésta se llevó a un volumen de 10mL con PEG 6000 así como también se procedió a la medición del tamaño de partícula, dichos resultados se muestran a continuación (Gráfico 3 y 4):

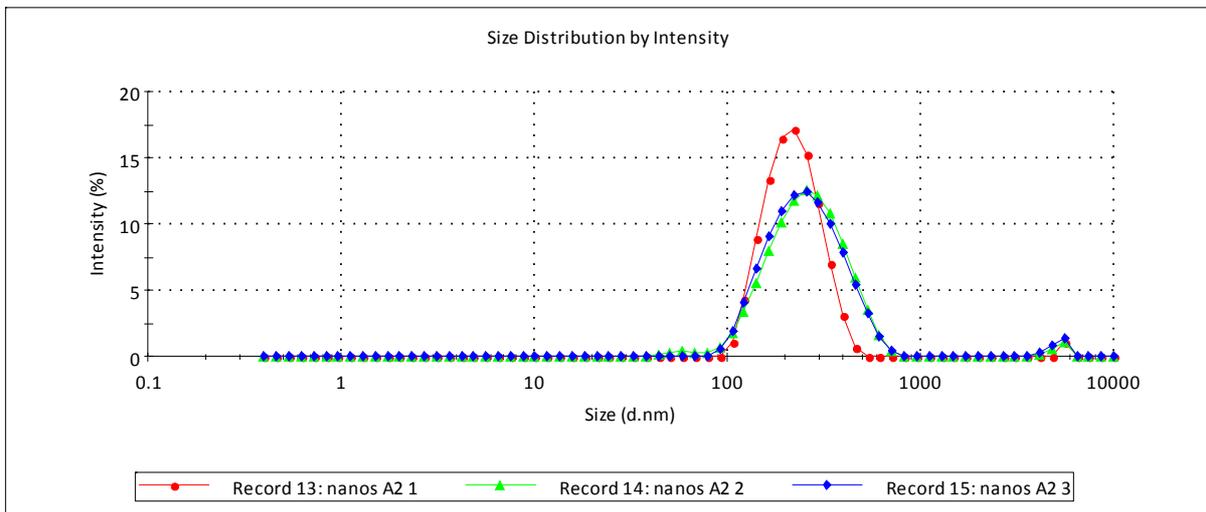


Gráfico 3. Tamaño de partícula correspondiente a 205.3nm posteriores al liofilizado.

El tamaño de partícula aumento a 200nm aproximadamente, lo cual puede deberse a la incorporación del PEG, ya que el arreglo de las cadenas de éste a nivel molecular puede afectar en la determinación del tamaño de partícula, pero beneficiar en la disminución de la formación de agregados. Si esta hipótesis es cierta quiere decir que habrá un aumento en el potencial zeta, lo que nos ayuda a responder la pregunta, anteriormente planteada sobre el efecto del exceso de Brij56 en las nanopartículas.(12)

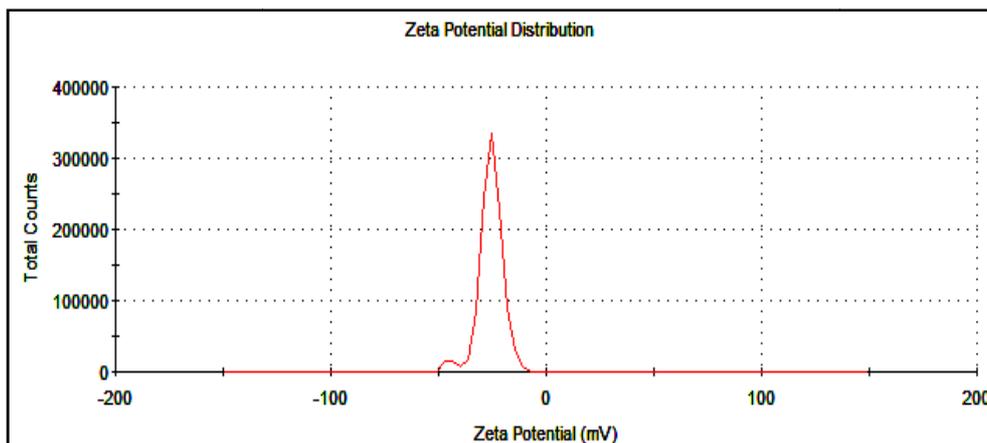


Gráfico 4. Potencial zeta -25.9 mV posterior al liofilizado.

Hay un aumento del potencial zeta que nos habla sobre una mayor repulsión entre partículas, el cual se le puede atribuir a la cantidad de PEG añadida para la redispersión de éstas; y aunque no de una forma totalmente determinante se puede establecer como un argumento resolutorio, que el exceso de Brij56, si afecta el potencial zeta, pero no propicia el aumento en la formación de agregados, esto quizá debido a la presencia de las cadenas de PEG. El Brij56 quizá ayuda a una interacción más cercana entre las moléculas del PEG y las moléculas de agua, provocando de este modo una disminución en el potencial.(12)

Se realizaron termogramas de cada uno de los componentes de las nanopartículas para poder observar la incorporación de la ivermectina en éstas; además para identificar la disminución de Brij56 y la cantidad de PEG que se recuperaron en los lavados.

Para poder llevar acabo esto, se recolectaron cada uno de los lavados y se sometieron a un proceso de secado por liofilizado, dicho liofilizado se llevo a cabo por 69 horas, a una temperatura de -20°C y 0.040mBar de presión de vacío, con un precongiamiento a -70°C por tres horas. Para tener una idea de cuál sería nuestro margen de error, en la recuperación de nuestro sólido una vez terminado dicho proceso, se realizaron varios ensayos de secado de una concentración de 1.5mg/mL de PEG y se colocaron 20mL en cada cajas petri, abarcando toda el

área de la liofilizadora, para poder obtener un índice de efectividad; los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4:

Tabla 4. Pruebas para la obtención del índice de efectividad en la recuperación por medio de liofilización.

Muestra	Peso (mg)	Peso Teórico (mg)	% Recuperación
A	26.9	30	89.7
B	27.2	30	90.7
C	27.8	30	92.7
D	27.1	30	90.3
		Promedio	90.85
		Desviación Estándar	1.3

Como se puede observar (Tabla 4) se obtuvo un promedio de 90.85%, con una desviación estándar de 1.3 y una DER de 1.43%; por lo tanto tenemos un porcentaje de recuperación del 90%, el cual es buen porcentaje de recuperación, lo que nos da un buen parámetro para llevar a cabo el liofilizado de los residuos obtenidos en los lavados de las nanopartículas para su posterior análisis por DSC.

A continuación se muestran los termogramas (Gráficas 5,6,7 y 8) realizados para los componentes de las nanopartículas y el obtenido de los lavados de éstas.

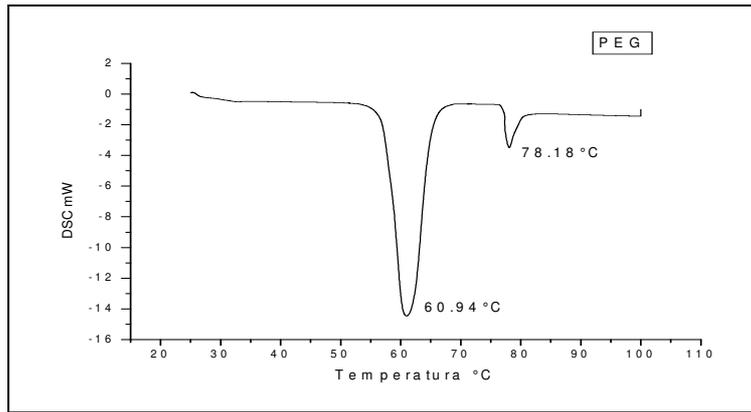


Gráfico 5. Termograma de Polietilenglicol 6000

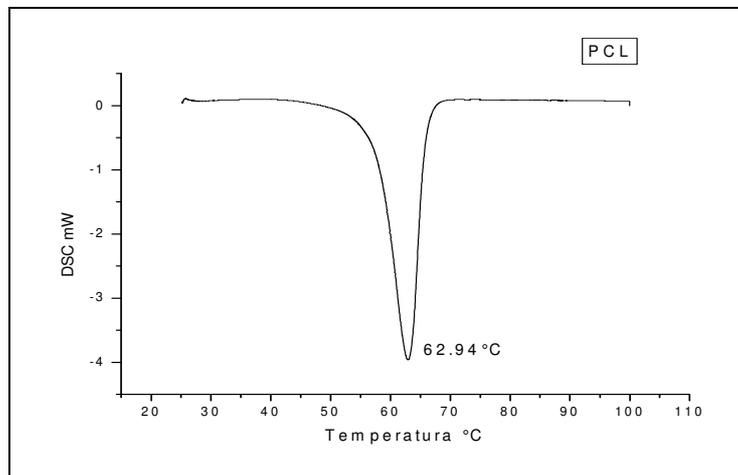


Gráfico 6. Termograma de PCL

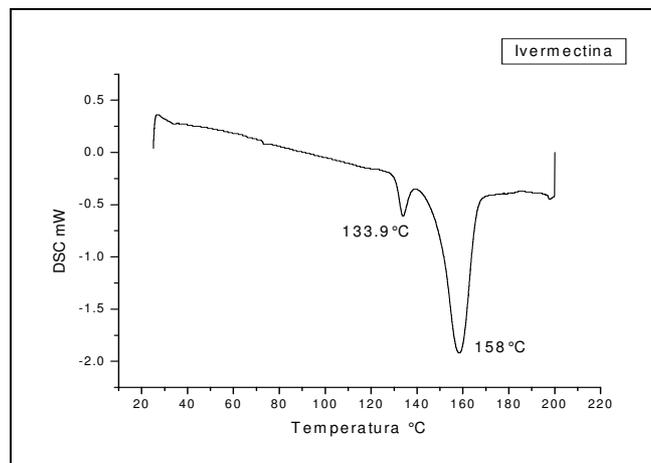


Gráfico 7. Termograma de Ivermectina.

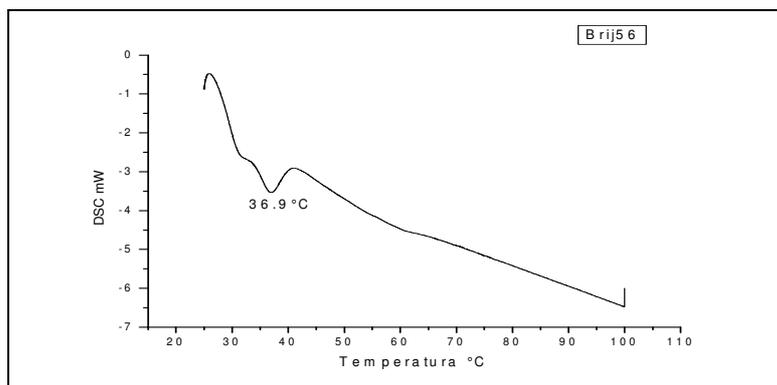


Gráfico 8. Termograma Brij 56.

Como se puede apreciar en los gráficos del 5 al 8, se pueden observar que los picos correspondientes al punto de fusión de cada componente en ningún caso se traslapan, lo cual nos permite utilizar este método para la identificación cualitativa del porcentaje de Brij56 eliminado con los lavados realizados en las partículas.

En el termograma (gráfico 9) que se le realizó a los lavados de las nanopartículas se puede observar que el área bajo la curva; correspondiente al punto de fusión del Brij56 es mucho mayor que el correspondiente al pico que se muestra para las partículas elaboradas. Dicho parámetro nos indica el ΔH de fusión y está relacionado con la cantidad de muestra colocada para el análisis térmico; que en nuestro caso fue de alrededor de 1 ± 0.1 mg, el termograma que se obtuvo para lo recolectado en los lavados de las nanopartículas es el esperado, dado que en esta fracción se debía encontrar el brij56 en mayor porción, como es visible en el gráfico 9; lo que no se esperaba era encontrar una pequeña pero visible fracción de partículas y los picos que quizá podrían corresponder a una cierta cantidad de ivermectina en 156.4°C , aunque cabe señalar que el máximo para la ivermectina se encuentra en 158°C , esta porción es muy pequeña en comparación con la cantidad de brij56 que se extrae.

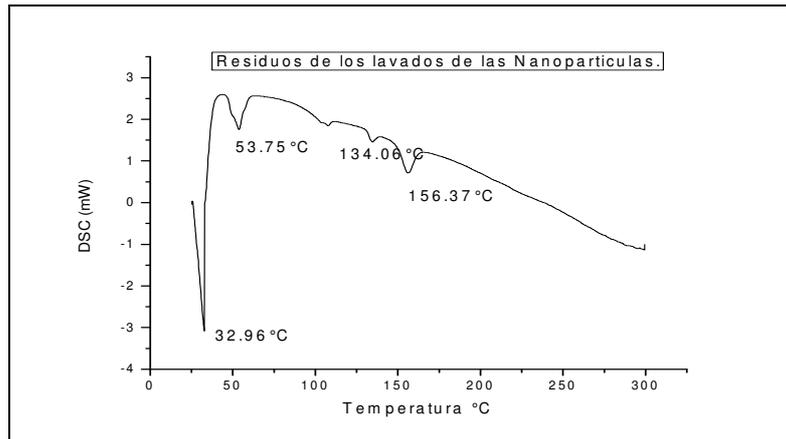


Gráfico 9. Termograma de lo recuperado en los lavados.

En el gráfico 10 se observa el máximo correspondiente para el Brij56; pero en comparación con el que se muestra en el gráfico 9, el área es mucho menor como era de esperarse, dado que en esta porción se espera estén formadas las nanopartículas, dando lugar a un desplazamiento de los componentes que las incorporan como se observa en los termogramas (gráficos 9 y 10) pero de nueva cuenta sobre salen otros dos picos con un máximo en 134 y 156.1 °C, estos picos tan repetitivos en estos últimos dos termogramas, pueden ser cierta cantidad de ivermectina que no se incorporo en la PCL y al ser detectada en el análisis térmico nos muestra que no se encuentra en una forma molecular, ya que si lo estuviera ésta no se detectaría; aún así el máximo en 54.36 °C, en comparación con otros termogramas realizados es muy similar al reportado para la identificación de las nanopartículas creadas.(12)

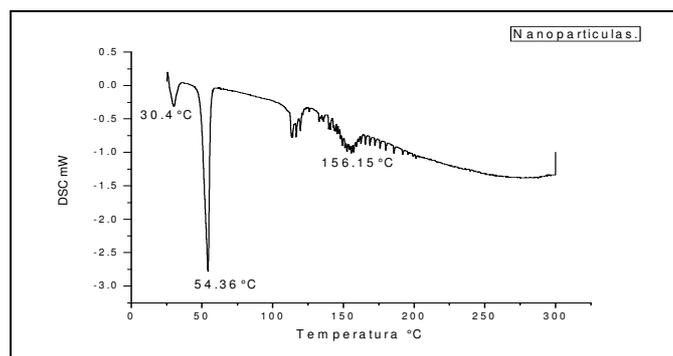


Gráfico 10. Termograma de las partículas realizadas después del lavado.

Obteniendo el área bajo la curva de los máximos que representan al Brij56, que la suma de ambas aéreas nos da un total de -3.939 el cual podemos considerar como nuestro 100%, de este modo podemos calcular un porcentaje calculado cualitativamente, en el cual nos indica que estamos quitando un 77% de Brij56 de las nanopartículas y el resto puede encontrarse incorporado dentro de las partículas elaboradas.(12)

6.2. PRUEBAS DE EFECTIVIDAD SOBRE LARVAS DE GARRAPATAS *Bophillus microplus.*

Los datos obtenidos mediante la técnica de Shaw, en larvas de garrapata *Bophillus microplus* para observar el efecto de los excipientes por esta técnica fueron, Brij56, Isopropanol, Polietilenglicol (PEG) y Cloruro de Sodio (NaCl); la policaprolactona y la ivermectina se realizaron por el método de Stone que se explica más adelante.

Para cada compuesto probado se elaboraron cinco concentraciones distintas; tomando como base y como punto medio la concentración presente en la formulación; como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 5).

Tabla 5. Concentraciones Analizadas en Larvas de Garrapata *Bophillus M.*

COMPUESTO	CONCENTRACION	Concentración real (mg/ml)
Brij56	14mg/ml	2.8
	16mg/ml	3.2
	18mg/ml	3.6
	20mg/ml	4
	22 mg/ml	4.4
Isopropanol	11 mg/ml	2.2
	13 mg/ml	2.6
	15 mg/ml	3
	17 mg/ml	3.4
PEG	19 mg/ml	3.8
	1.1g/L	0.22
	1.3g/L	0.26
	1.5g/L	0.3
	1.7g/L	0.34
NaCl	1.9g/L	0.38
	0.0006%	0.0012
	0.0008%	0.0016
	0.001%	0.0020
	0.0012%	0.0024
	0.0014%	0.0028

Para realizar la prueba de Shaw se prepararon las soluciones con las concentraciones que se muestran en la tabla 5; de las cuales se tomo 20mL de estas soluciones, y se aforaron a 100mL y de esta solución se tomaron 10 mL, las cuales se colocaron en una caja petrí que contenía un papel filtro; el cual se humedeció con dicha solución, posteriormente se pesaron aproximadamente 100mg de larvas, las cuales se sumergieron en esta solución por 10 minutos, con ayuda de un papel filtro. Posteriormente se realizaron paquetes (papeles filtro doblados) en los cuales, se colocaron aproximadamente 100 larvas (tomadas de los 100mg anteriormente pesados) y estos se metieron a la incubadora a 37°C y una humedad de 70% aproximadamente. Después de siete días de incubación, se realizó el conteo de larvas de garrapatas para obtener un porciento de mortalidad; estos resultados se muestran a continuación.

6.2.1. Resultados de la prueba Shaw y Stone.

Tabla 6. Mortalidad encontrada de las Larvas de **Bophillus m.** Mediante la Técnica de Shaw.

COMPUESTO	CONCENTRACION	Resultados Shaw (Triplicado)	
		Larvas vivas.	Larvas muertas.
Brij56	14mg/ml	100	
	16mg/ml	100	
	18mg/ml	100	
	20mg/ml	100	
	22 mg/ml	100	
Isopropanol	11 mg/ml	100	
	13 mg/ml	100	
	15 mg/ml	100	
	17 mg/ml	100	
	19 mg/ml	100	

Tabla 7. Mortalidad encontrada Mediante la Técnica de Shaw en larvas de **Bophillus M.**

COMPUESTO	CONCENTRACION	Resultados Shaw (Triplicado)	
		Larvas vivas.	Larvas muertas.
NaCl	0.0012 mg/mL	100	
	0.0016 mg/mL	100	
	0.0020 mg/mL	100	
	0.0024 mg/mL	100	
	0.0028 mg/mL	100	
Agua	Testigo	100	
PEG	1.1mg/mL	100	
	1.3mg/mL	100	
	1.5mg/mL	100	
	1.7mg/mL	100	
	1.9mg/mL	100	

Tanto la ivermectina y la policaprolactona (PCL) se realizaron por el método de Stone debido a que estos compuestos son insolubles y esta metodología nos permite trabajar con compuestos de estas características. Los resultados obtenidos se muestran a continuación: Tomando como concentraciones las normas establecidas en el laboratorio de parasitología de la facultad de veterinaria

Tabla 8. Mortalidad de las Larvas de **Bophillus M.** por la Técnica de Stone.

Compuesto	Concentración	Resultados.		Total Larvas	Mortalidad %
		Larvas vivas.	Larvas muertas.		
PCL (84.2mg)	A (3.4mg/ml)	100	-		0
		100	-		0
	B (1.6mg/ml)	100	-		0
		100	-		0
	C (0.8mg/ml)	100	-		0
		100	-		0
	D (0.4mg/ml)	100	-		0
		100	-		0
	E (0.2mg/ml)	100	-		0
		100	-		0
Ivermectina (84.2mg)	A (3.3mg/ml)	19	361	380	95
		15	450	465	96.77
	B (1.6mg/ml)	152	154	306	50.33
		132	206	338	60.95
	C (0.8mg/ml)	100	-		0
		100	-		0
	D (0.4mg/ml)	100	-		0
		100	-		0
	E (0.2mg/ml)	100	-		0
		100	-		0
Agua	Testigo	100	-		0
		100	-		0

Como se aprecia en la anterior tabla (Tablas 8) no existe concentración de PCL que mate a las garrapatas; sin embargo con la ivermectina sí, dado que este fármaco funciona como un acaricida, por lo que este efecto debería ser normal, a no ser porque su efecto lo ocasiona a partir de una concentración de 1.6mg/mL, teniendo una efectividad del 55% de mortalidad, dicha mortandad se vio aumentada hasta un 96% cuando la concentración de ivermectina es de 3.3mg/mL, concentración que se obtiene al seguir esta metodología.

-Al observar que los componentes de nuestra formulación no son dañinos para las larvas de garrapata, exceptuando la ivermectina, se procedió a realizar las mismas pruebas antes mencionadas; pero ahora con cada uno de los componentes dentro de la formulación, esperando que no hubiera muerte de las larvas de garrapatas; ya que, la metodología que se empleo para probar las nanopartículas fue la de

Shaw esto con el fin de lograr que no se liberara el fármaco por causa de la disolución del polímero; porque en las nanopartículas, la ivermectina está recubierta por un polímero; en este caso, policaprolactona (PCL) o ácido poliláctico (PLA), impidiendo de este modo que ésta entre en contacto con la larva de garrapata; además de que la cantidad que tendría contacto con el parásito sería, una cantidad mínima. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9, en donde se analizaron las nanopartículas elaboradas con PLA las cuales contienen pluronic, aceite de ricino e ivermectina; dichas partículas se incluyen en los perfiles toxicológicos e histopatológicos

Tabla 9. Mortalidad de Distintas Formulaciones Analizadas por Shaw.

Compuesto	Concentración de Nanopartículas. Brij56 50.92%, Isopropanol 41.02%, PCL 3.48%, Ivermectina 0.34%, PEG 4.24%	Concentración Real de Nanopartículas. (después de las diluciones para la metodología de Shaw)	Resultados.		Total.	% Mortalidad
			Larvas vivas.	Larvas muertas		
Nanopartículas (11/agosto/08)	0.12mg/ml	0.024mg/ml	22	84	106	79.24
			23	89	112	79.46
			30	44	74	59.46
Nanopartículas con NaCl 0.001% (1/sept/08)	0.12mg/ml	0.024mg/ml		100	100	100
				100	100	100
				100	100	100
Nanopartículas con PEG 6000	0.12mg/ml	0.024mg/ml	8	67	75	89.33
			3	56	59	94.91
			3	63	66	95.45
Nanopartículas de PLA	1.2mg/ml	0.24mg/ml	17	75	92	81.52
			5	44	49	89.79
			76	63	139	45.328

Los resultados obtenidos (Tabla 9) no fueron los esperados, debido a que en todas las formulaciones hubo muerte de larvas de garrapatas, mostrando un alto índice de efectividad, por lo que surgió la siguiente pregunta; ¿se está

recubriendo bien la ivermectina?; o existirá un efecto sinérgico entre algunos de los componentes, siendo esta última poco probable; ya que en los estudios individuales de cada uno de estos, no hubo porcentaje de mortalidad.

Dadas las cuestiones anteriores se decidió realizar una retrospectiva de los cálculos, para determinar exactamente qué concentración del principio activo y de los componentes de la formulación, se probaron. Así como un análisis de las concentraciones que existen en la formulación elaborada; con el fin de determinar si hubo un error en cuanto a cantidades agregadas en la formulación.

Cada uno de los cálculos realizados así como, el análisis para determinar las cantidades probadas, se muestra a continuación.

Tomando en consideración que la densidad del Brij56 es igual a 977mg/mL y como el volumen que se añade de éste compuesto es de 1.47mL, entonces la concentración de Brij56 en la formulación está dada por:

$$1.47mL \times \frac{977mg}{1mL} = 1436.19mg \text{ Brij56}$$

La cantidad de Brij56 es 1436.19mg por lo tanto la concentración de Brij56 al final de la formulación es de 18mg/mL:

$$\frac{1436.19mg \text{ Brij56}}{80mL} = \frac{17.95mg}{mL} \cong \frac{18mg}{mL} \text{ de Brij56}$$

Siguiendo los mismos pasos que se realizaron para el cálculo anterior, se procede a determinar la concentración del Isopropanol.

Isopropanol $\rho=790mg/mL$

$$1.47mL \times \frac{790mg}{1mL} = 1161.3mg \text{ Isopropanol}$$

$$\frac{1161.3mg \text{ Isopropanol}}{80 mL} = 14.5 \frac{mg}{mL} \text{ de Isopropanol}$$

Calculo para determinar la concentración de PCL y de Ivermectina.

Cantidad que se añadió de PCL 98.3 mg

$$\frac{98.3\text{mg PCL}}{80\text{mL}} = \frac{1.23\text{mg}}{\text{mL}} \text{ de PCL}$$

Cantidad agregada de Ivermectina 9.8mg

$$\frac{9.8\text{mg}}{80\text{mL}} = \frac{0.123\text{mg}}{\text{mL}} \text{ de Ivermectina}$$

La concentración de PEG 6000 es igual a 1.5mg/mL y de esta solución se tomaron 80mL que es el volumen final de la formulación, por eso los compuestos anteriores se dividieron entre 80mL. Al igual que la concentración de PEG, la concentración de NaCl se mantiene, dado que aquellas nanopartículas que no se elaboraron con PEG 6000, se les agregó 80 mL de NaCl a una concentración de 0.01mg/mL.

Tabla 10. Excipientes de las Nanopartículas de Ivermectina con PCL.

Concentración de cada excipiente en la Formulación	
PEG	1.5mg/mL
PCL	1.23 mg/mL
ivermectina	0.12 mg/mL
isopropanol	14.5mg/mL
Brij 56	18mg/mL
las nanopartículas que tienen NaCl	
NaCl	0.01mg/mL

Las concentraciones de cada uno de los excipientes en la formulación de nanopartículas realizadas con PEG 6000, en las distintas soluciones utilizadas para el ensayo por medio de la técnica de Shaw, se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 11. Concentraciones de cada uno de los Excipientes en las Nanopartículas con PEG 6000 (Desde la Solución H-E)

Excipiente	Nanos con PEG (mg/mL) H	Nanos con PEG (mg/mL) G	Nanos con PEG (mg/mL) F	Nanos con PEG (mg/mL) E
PEG	2.70E-01	9.18E-02	2.75E-02	9.36E-03
PCL	2.20E-01	7.48E-02	2.24E-02	7.63E-03
Ivermectina	2.20E-02	7.48E-03	2.24E-03	7.63E-04
Isopropanol	2.61E+00	8.87E-01	2.66E-01	9.05E-02
Brij56	3.24E+00	1.10E+00	3.30E-01	1.12E-01

Tabla 12. Concentraciones de cada uno de los Excipientes en las Nanopartículas con PEG 6000 (Desde la Solución D-A)

Excipiente	Nanos con PEG (mg/mL) D	Nanos con PEG (mg/mL) C	Nanos con PEG (mg/mL) B	Nanos con PEG (mg/mL) A
PEG	2.8E-03	9E-04	3E-04	8.59E-05
PCL	2.3E-03	8E-04	2E-04	7.004E-05
Ivermectina	2E-04	7.78E-05	2.33E-05	7.004E-06
Isopropanol	2.72E-02	9.2E-03	2.8E-03	8E-04
Brij56	3.37E-02	1.14E-02	3.4E-03	10E-04

En las siguientes dos tablas se muestran las distintas concentraciones, que se emplearon para llevar a cabo la técnica de Shaw, en la formulación de nanopartículas, en la cual se utilizó NaCl en lugar de PEG 6000, como agente estabilizador de éstas.

Tabla 13. Concentraciones de cada uno de los Excipientes en las Nanopartículas con NaCl (Desde la Solución H-E)

Excipiente	Nanos con NaCl (mg/mL) H	Nanos con NaCl (mg/mL) G	Nanos con NaCl (mg/mL) F	Nanos con NaCl (mg/mL) E
NaCl	8.00E-04	2.72E-04	8.16E-05	2.77E-05
PCL	2.30E-01	7.82E-02	2.35E-02	7.98E-03
Ivermectina	2.20E-02	7.48E-03	2.24E-03	7.63E-04
Isopropanol	2.67E+00	9.08E-01	2.72E-01	9.26E-02
Brij56	3.30E+00	1.12E+00	3.37E-01	1.14E-01

Tabla 14. Concentraciones de cada uno de los Excipientes en las Nanopartículas con NaCl (Desde la Solución D-A)

Excipiente	Nanos con NaCl (mg/mL) D	Nanos con NaCl (mg/mL) C	Nanos con NaCl (mg/mL) B	Nanos con NaCl (mg/mL) A
NaCl	8.32E-06	2.83E-06	8.49E-07	2.55E-07
PCL	0.0024	0.0008	0.0002	7.3E-05
Ivermectina	0.0002	7.78E-05	2.3347E-05	7.004E-06
Isopropanol	0.0278	0.0094	0.00283343	0.0009
Brij56	0.0343	0.0117	0.00350199	0.0010

Como se puede observar en las Tablas 11 y 12 las concentraciones presentes en las nanopartículas con PEG 6000 son totalmente inferiores a las que se probaron por la técnica de Shaw para probar por si solos los distintos componentes de la

formulación, (Ver Tabla 5), así como también las concentraciones presentes en las nanopartículas con NaCl son inferiores a las probadas para cada componente.

En la Tabla 15 se muestra la concentración reales que existen en cada una de las nanopartículas preparadas tanto las que contienen PEG y las de NaCl; en comparación con la solución más concentrada de cada uno de los excipientes que se probaron.

Tabla 15. Comparación de Concentraciones de los Componentes que se Analizaron por la Técnica de Shaw y las Concentraciones de estos en las Nanopartículas.

COMPUESTO	Concentración en la solución H de cada uno de los componentes de las nanopartículas (mg/mL)	Nanos con PEG (mg/mL) H Concentración de cada componente en la formulación.	Nanos con NaCl (mg/mL) H Concentración de cada componente en la formulación.
Brij56	4.4	3.24	3.30
Isopropanol	3.8	2.61	2.67
PEG	0.38	2.70E-01	
NaCl	0.0028		8.00E-04
PCL	3.37mg/mL	2.20E-01	2.30E-01
Ivermectina	3.37mg/mL	2.20E-02	2.20E-02

Como se puede apreciar, las cantidades que se probaron para analizar el efecto de cada uno de los excipientes por separado, son superiores a las que se emplearon en las formulaciones finales, lo que nos hace pensar que, la muerte de las larvas no fue debida a altas concentraciones de los excipientes y podría deberse a un efecto sinérgico de éstos o de un par de ellos. Aunque otra variable a considerar sería las condiciones de incubación.

Para prevenir que los resultados encontrados con las larvas, se presentaran con los mamíferos se decidió realizar perfiles de toxicidad con los componentes de las nanopartículas.

6.3 PERFILES DE TOXICIDAD DE LOS COMPONENTES DE LAS NANOPARTÍCULAS.

Para este estudio se administraron diversas dosis a 264 ratones hembra ICR, dicha cantidad fue establecida para utilizar el menor número de ratones que fue ese posible; estuvieron bajo una temperatura de $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, una humedad relativa de 55% y un ciclo de luz/oscuridad de 12/12hrs; se seleccionaron hembras porque en

ellas existe mayor presencia de tejido graso y la ivermectina se acumula en mayor medida en éste, la vía de administración fue intraperitoneal, para tener una rápida absorción y una gran vascularización. Dicho estudio se realizó para cada uno de los excipientes presentes en la formulación de las nanopartículas, este experimento se dividió en dos etapas.

En la primera etapa se administró Agua inyectable (como blanco), Isopropanol, PEG 6000 (polietilenglicol 6000), Nanopartículas con PEG, Nanopartículas con NaCl (cloruro de sodio), Nanopartículas con PLA (Ácido poliláctico) y Brij56 (tensoactivo no iónico). Las dosis administradas fueron las que se muestran en la tabla 16, las cuales se escogieron en un orden exponencial para obtener un perfil amplio de identificación de la toxicidad de los componentes.

Tabla 16. Concentraciones de las Soluciones Administradas.

Solución	Dosis (mg/Kg)	Concentración (mg/mL)
A	1	0.06
B	3	0.18
C	10	0.6
D	30	1.8
E	100	6
F	300	18
G	1000	60
H	3000	180

En aquellos ratones a los cuales se les administró Isopropanol, se observó en los que recibieron la dosis más alta (H: 3000mg/Kg), mucha irritación en el momento de la administración y posteriormente se quedaron sin movilidad alguna presentando una respiración muy lenta; sin embargo después de 24 horas de la administración se encontraban completamente restablecidos y con una actividad normal.

A los ratones que se les administro Brij56 (disuelto en PEG 1.8 mg/mL) presentaron dolor y manifestaron un ataque de ansiedad (corrieron por toda la caja), después de una hora de habérseles administrado dicha solución; en las soluciones G (ratones 43,44 y 45) y H (ratones 46,47 y 48), pertenecientes a las dosis más altas, 1000 y 3000 mg/Kg respectivamente, murieron. Posteriormente se les realizó una necropsia a los ratones 48, 47 y 45; en la cual se observó lo siguiente:

- ❖ Ratón 48. Se observó un estado cianótico; con las vísceras congestionadas, peritoneo, corazón y pulmones congestionados. Además de una hemoconcentración en vísceras.

Lo antes mencionado nos indica que la dosis del reactivo administrado, provocó una irritación severa en el ratón y esto le produjo la muerte.

- ❖ Ratón 47. Al igual que en el anterior animal, se observaron vísceras, corazón, peritoneo y pulmones congestionados; además de una extravasación, ascitis (presencia de líquido seroso en el espacio que existe entre el revestimiento membranoso del abdomen y los órganos abdominales) y un poco de hemorragia. Presenta las mismas condiciones de muerte que el ratón 48, lo cual era de esperarse, ya que pertenecen al grupo al cual se les administró la solución H (Brij56 en PEG 1.8mg/mL, dosis 3000mg/Kg).

- ❖ Ratón 45. Se observó una menor coloración rojiza en los órganos; aunque se encontró la misma congestión que se halló en los ratones anteriores. Todo esto nos indica una alta dosis administrada de Brij56, lo cual produjo la muerte de los ratones.

Los ratones a los cuales se les administro la dosis F (300mg/Kg) murieron después de haber transcurrido 3 horas de administración, mientras tanto los ratones a los que se les administró la dosis E (100mg/Kg), continuaron con actividad normal y sin aparentes repercusiones de está dosis. Con respecto a los otros ratones, a los cuales se les administro Brij56, no se observó anomalía alguna; aunque algunos de estos presentaban gran actividad; pero después de observarlos durante 4 semanas, se llegó a la conclusión de que este comportamiento es normal en los ratones.

En el séptimo día de observación de esta primera etapa del experimento, algunos de los ratones presentaron gran actividad durante el día, lo cual es raro debido a que estos animales son nocturnos; la explicación para este extraño comportamiento fue que a los ratones los acababan de cambiar de la caja en la que se encontraban y por ese motivo estaban activos.

La secuencia de observación de los ratones a los que se les administraron los reactivos establecidos para esta primera etapa del experimento, se muestra en la siguiente tabla (Tabla 17):

Tabla 17. Seguimiento del comportamiento de los Ratones posterior a la administración de excipientes.

Días de observación	Observaciones
Primer día	Ratones tranquilos y sin inflamación en el sitio de administración.
Segundo día	Ratones tranquilos y sin aparente alteración de su comportamiento.
Tercer día	Ratones tranquilos y sin aparente alteración de su comportamiento.
Cuarto día	Ratones tranquilos y sin aparente alteración de su comportamiento.
Quinto día	Ratones tranquilos y sin aparente alteración de su comportamiento.
Sexto día	Se encontraron a los ratones muy inquietos, ansiosos mordiéndose entre ellas y dando vueltas por toda la caja.
Séptimo día	Primera observación (11:00am). Todos los ratones muestran actividad diurna, lo cual es raro debido a que su actividad es nocturna. Segunda observación (4:00 pm). Ratones de la caja 109-114 presentan actividad.
Octavo día	Primera observación (12:30 pm). Los ratones de las cajas 97-102 están activos, los de las demás cajas están dormidos. En la caja 7-12 hay una muy inquieta, la número 10. Segunda observación (5:30). El ratón de la caja 7-12 sigue activo. Todos los ratones presentan actividad y algunos están comiendo. Animales de la caja 121—126 dan unos brincos muy raros como canguros y están comiendo aserrín.
Noveno día	Primera observación (11:00 am). En la caja de los ratones número 139-144 hay uno muy activo y da vueltas por toda la jaula. Ratones activos cajas (55-60)(115-120)(139-144). Segunda observación (5:08pm). Los ratones están activos, comiendo y mordiendo los barrotes; todo esto una hora antes de que se apague la luz.
Decimo día	Este día se realizó la última observación algunos de los ratones estaban activos y otros estaban dormidos, después de diez días de observación este tipo de comportamiento se considera normal.

En el onceavo día se procedió a realizar una necropsia a aquellos ratones a los cuales se les había administrado la dosis más alta y por lo tanto la de mayor concentración (H); se observó lo siguiente:

Tabla 18. Observaciones de las Necropsias.

Compuesto Administrado	Observaciones después de una semana de administración.
Isopropanol.	Se observó en buen estado cada uno de los órganos (Pulmón, Corazón, Hígado, Intestino y Bazo), sin malformaciones o daños en su morfología.
Nanopartículas con PEG.	Se observó en buen estado cada uno de los órganos (Pulmón, Corazón, Hígado, Intestino y Bazo), sin malformaciones o daños en su morfología.
PEG (Polietilenglicol 6000)	Se observaron los órganos (Pulmón, Corazón, Hígado, Intestino y Bazo) en buen estado; aunque se observa una coloración pálida de cada uno de los órganos.
Nanopartículas PLA	Los órganos (Pulmón, Corazón, Hígado, Intestino y Bazo) se encontraron en buen estado, sin daño en su morfología.
Nanopartículas con NaCl	Se observó ascitis, con un poco de adherencias (Causado por Irritación), el hígado presentó anomalías morfológicas y riñones más grandes y pálidos. Ver la figura 15.



Figura 15. Hígado con Deformaciones Morfológicas.

A cada uno de los órganos analizados, se les realizó un diagnóstico histopatológico, para observar el daño que los excipientes, en su más alta concentración (3000mg/Kg), pudieron causar en cada uno de los órganos extraídos (corazón, pulmón, páncreas, riñón e hígado); dichos resultados se muestran más adelante.

Con respecto a los perfiles toxicológicos, encontrados en esta primera etapa, el único que presentó un 100 % de mortalidad, en las tres dosis más altas, fue el Brij56. A continuación, se muestran las gráficas correspondientes para Brij56, Isopropanol, PEG 6000, nanopartículas con PEG, NaCl y PLA.

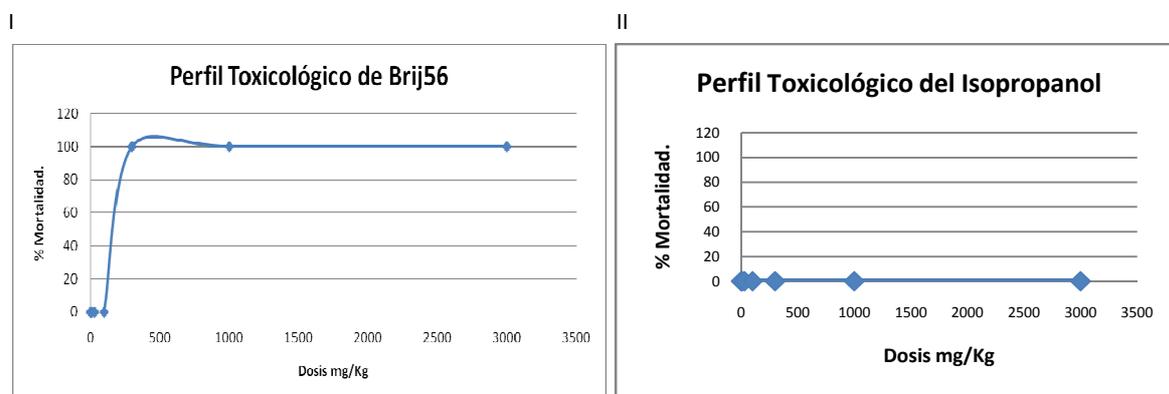
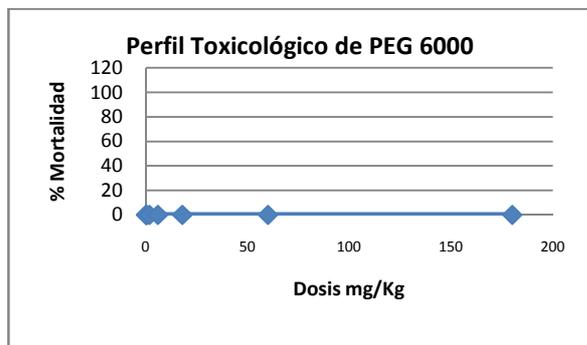
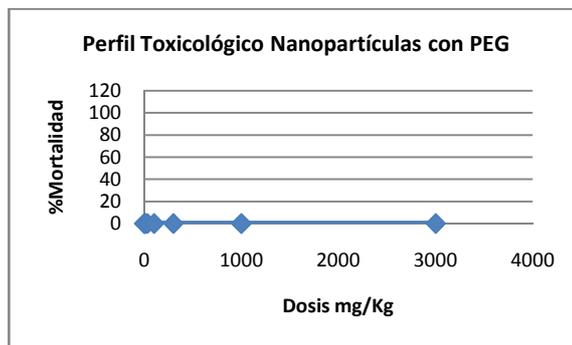


Gráfico I y II. En la gráfica I se observa el efecto que presentaron las tres dosis más altas del Brij56, disuelto en PEG 6000. Mientras que en la gráfica II se observa que ninguna de las dosis del Isopropanol, causó la muerte de algún ratón.

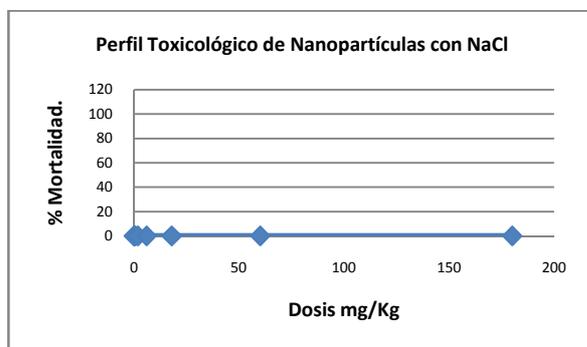
III



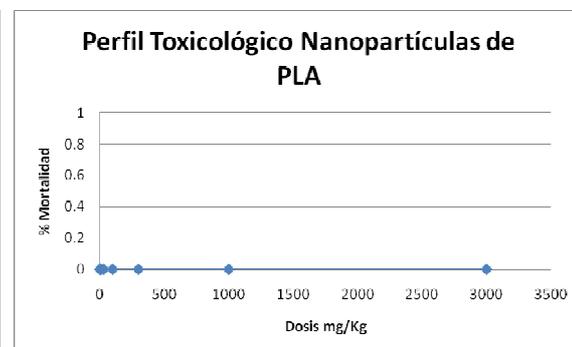
IV



V



VI



Gráficos III, IV, V y VI. Perfiles Toxicológicos de los Excipientes Analizados en esta Primera Etapa del Experimento; así como también de algunas nanopartículas elaboradas.

El Gráfico I; correspondiente al Brij56, muestra que a dosis superiores de 300mg/Kg; es decir a una concentración de 18mg/mL existe una toxicidad aguda en los ratones; esto por vía intraperitoneal, no siendo el mismo caso para el Isopropanol, las Nanopartículas con PEG 6000, el Polietilenglicol 6000 (PEG6000), las Nanopartículas con NaCl y las Nanopartículas con PLA, como se puede apreciar en las gráficas III, IV, V y VI, en cuyos casos no hubo porcentaje de mortalidad de ratones.

La toxicidad presentada por el Brij56 se encuentra entre dos puntos referentes a una dosis de 100 y 300 mg/Kg, por lo cual, **no se puede establecer un valor viable para la DL₅₀ (dosis letal media), ya que se tendrían que realizar mínimo otro ensayo, para obtener un punto intermedio entre las dosis y de este modo obtener el valor de la DL₅₀.**

Con el fin de obtener un valor estimado en el cual se podría presentar la DL₅₀, se realizó un análisis estadístico Probit mediante el programa StartPlus2007 Profesional con el cual se obtuvo la DL₅₀ de 200 mg/Kg para el Brij56 de cual es el límite superior para que dicho compuesto sea letal, al ser administrado por esta vía (intraperitoneal).

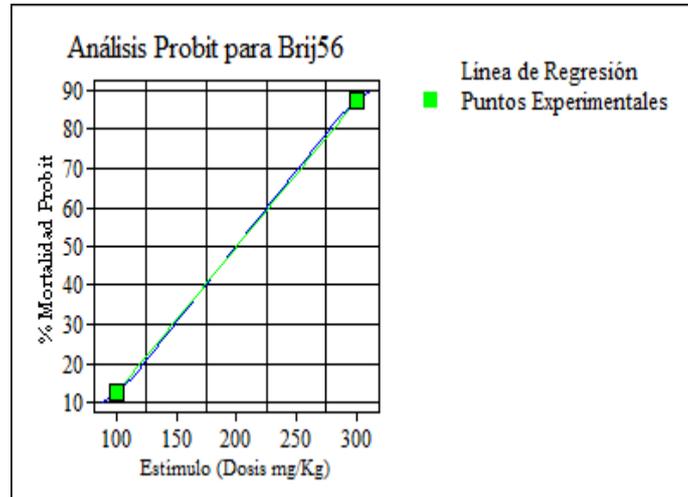


Gráfico 11. Estimación de la DL₅₀ del Brij56 200mg/Kg.

Por lo tanto DL₅₀ aproximada es de = 200mg/Kg

Siendo el peso promedio de los ratones = 0.026Kg
y el volumen promedio administrado a los ratones = 0.4mL

$$\frac{200mg}{Kg} \times 0.026Kg = 5.2mg$$

$$\frac{5.2mg}{0.4mL} = 13mg/mL$$

Por lo tanto la concentración de la DL₅₀ = **13mg/mL**

Esta concentración es inferior a la que existe en la formulación de las nanopartículas; por lo cual se hubiera esperado que en aquellos ratones en los cuales se les administraron las nanopartículas hubieran presentado un porcentaje de mortalidad; aunque quizá en las nanopartículas el Brij56 no este tan disponible; como sí se encuentra en las soluciones probadas. La única variable entre las soluciones de Brij56 preparadas y el presente en las nanopartículas es que, las

soluciones de Brij56 fueron preparadas con una concentración de 1.8 mg/mL de PEG 6000, con el fin de facilitar la solubilidad de este tensoactivo.

Debido a que el PEG 6000 es un cosolvente, éste pudo haber ayudado a mejorar la disponibilidad del Brij56 en el organismo, lo cual propiciaría una alta toxicidad de éste, ya que habría una mayor distribución en el área peritoneal, lo que nos daría como resultado una mayor área de contacto; causando una alta mortalidad debido a que el Brij56 estaría en contacto con más órganos, no siendo éste el caso para el Brij presente en las nanopartículas.

En la segunda etapa del experimento se probaron con la ivermectina, ϵ -policaprolactona (PCL), aceite de ricino, ácido poliláctico (PLA), pluronic y de nuevo se volvió a utilizar Agua inyectable como blanco. Las dosis fueron las mismas que se utilizaron en la primera etapa y se muestran en la siguiente tabla (Tabla 19).

Tabla 19. Concentraciones de las Soluciones Administradas.

Solución	Dosis (mg/Kg)	Concentración (mg/mL)
A	1	0.06
B	3	0.18
C	10	0.6
D	30	1.8
E	100	6
F	300	18
G	1000	60
H	3000	180

Las observaciones realizadas a los ratones, durante una semana posterior a la administración de cada uno de los compuestos, se muestran a continuación:

Días de observación	Observaciones
Primer día	La mayoría de los ratones, estuvieron sin problema alguno, después de la administración de los compuestos con sus respectivas dosis. Los únicos que presentaron un cambio radical en su estado de salud fueron a los que se les administró la dosis G y H de aceite de ricino, los cuales presentaron respiración lenta y con dificultad.
Segundo día	Segunda observación (6:08pm). Después de 2 horas de administración, del aceite de ricino, murieron los ratones de la dosis H. Los demás presentan actividad normal. Todos los ratones quietos y tranquilos; aunque se alteraron un poco después de hacer ruido pero nada fuera de lo normal.
Tercer día	Todos los ratones están quietos y tranquilos sin daño alguno.
Cuarto día	Los ratones están bien y normales.
Quinto día	Presentan actividad normal.
Sexto Día	Presentan actividad normal
Séptimo día	Todos los ratones activos, pero con actividad normal.
Octavo día	Con actividad Normal.

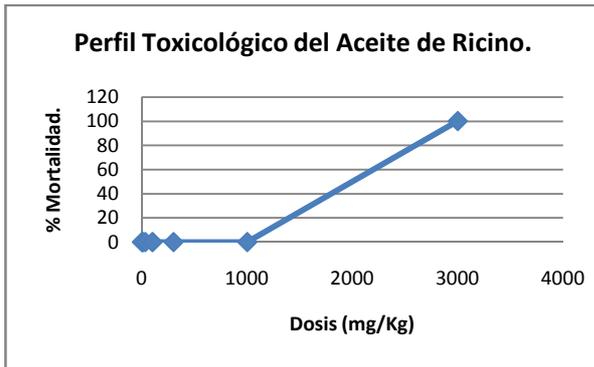
Después de diez días al igual que en la primera etapa se llevó a cabo una necropsia de los ratones a los cuales se les administró la dosis más alta (H), se obtuvieron las siguientes observaciones:

Compuesto Administrado	Observaciones después de una semana de administración.
<i>Policaprolactona-ε.</i>	Se observa en buen estado cada uno de los órganos (Pulmón, Corazón, Hígado, Intestino y Bazo), sin malformaciones o daños en su morfología.
<i>Agua</i>	Se observa en buen estado cada uno de los órganos (Pulmón, Corazón, Hígado, Intestino y Bazo), sin malformaciones o daños en su morfología.
<i>Ivermectina.</i>	Se observó en buen estado cada uno de los órganos (Pulmón, Corazón, Hígado, Intestino y Bazo), sin malformaciones o daños en su morfología.
<i>Aceite de Ricino.</i>	Se observó una cantidad exagerada de líquido transparente (Aceite de ricino) al iniciar la necropsia; pero los órganos se veían en buen estado.
<i>PLA</i>	Los órganos (Pulmón, Corazón, Hígado, Intestino y Bazo) se encontraron en buen estado, sin daño en su morfología.
<i>Pluronic</i>	Se observaron los órganos (Pulmón, Corazón, Hígado, Intestino y Bazo) en buen estado; aunque se observa una coloración pálida de cada uno de los órganos

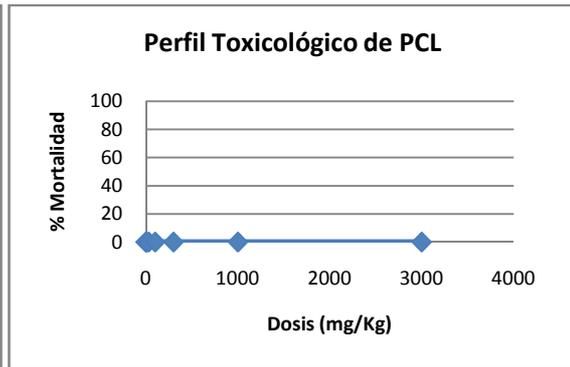
De acuerdo a los perfiles toxicológicos, encontrados en esta segunda etapa, en el único en el cual murieron los ratones, en las tres dosis más altas, fue con el aceite de ricino.

A continuación, se muestran las gráficas correspondientes para aceite de ricino, ivermectina, ε-policaprolactona (PCL), ácido poliláctico (PLA) y pluronic F-127.

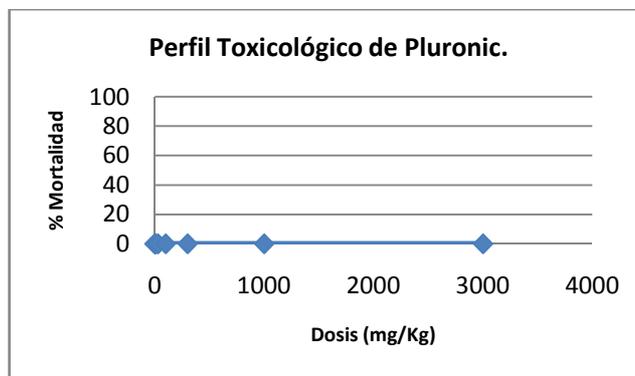
I



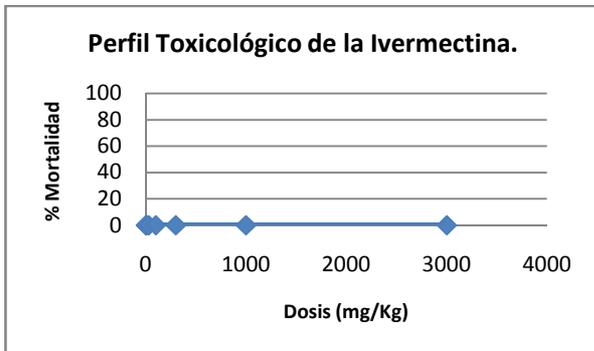
II



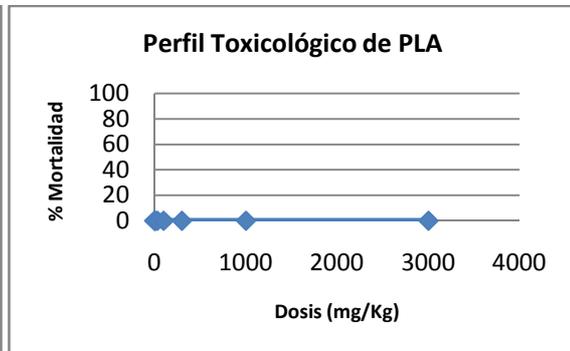
III



IV



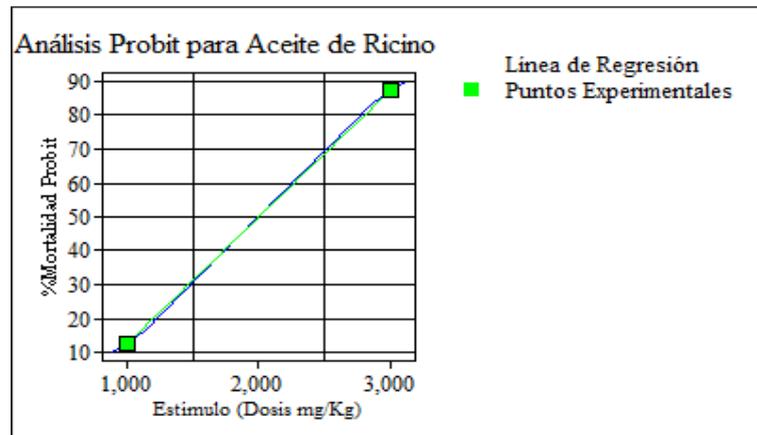
V



Como se puede apreciar en las graficas anteriormente mostradas, el porcentaje de mortalidad en la mayoría de los compuestos fue nulo; siendo el aceite de ricino el único en el cual, en la última dosis (las de mayor concentración) presenta un 100% de mortalidad.

Al igual que para el caso del Brij56, con la finalidad de obtener un estimado y poder determinar aproximadamente la DL_{50} del aceite de ricino, se realizó un

análisis estadístico Probit con el programa ya mencionado y se obtuvo una DL₅₀ de 2000mg/Kg



Por lo tanto DL₅₀ aproximada es de 2000mg/Kg para determinar la concentración de esta dosis, realizamos los siguientes cálculos:

$$\begin{aligned}
 \text{Peso promedio de los ratones} &= 0.025\text{Kg} \\
 \text{Volumen promedio administrado a los ratones} &= 0.4\text{mL} \\
 \frac{2000\text{mg}}{\text{Kg}} \times 0.025\text{Kg} &= 50\text{mg} \\
 \frac{50\text{mg}}{0.4\text{mL}} &= 125\text{mg/mL}
 \end{aligned}$$

Por lo tanto la concentración de la DL₅₀ = **125mg/mL**

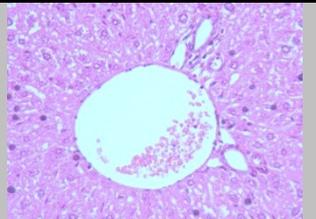
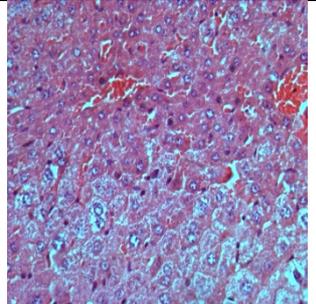
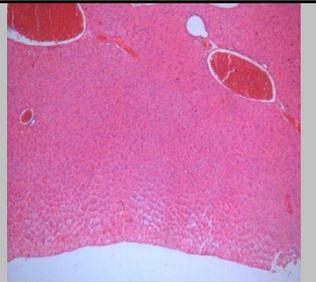
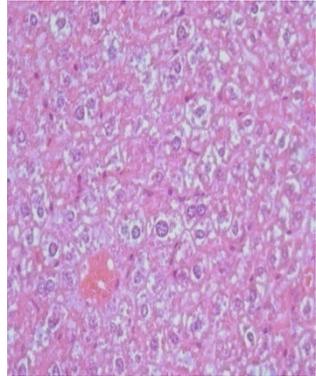
La concentración de la DL₅₀ es más de 30 veces mayor a la que se encuentra en las nanopartículas de PLA, por lo que dicha concentración no representa o representará ningún problema al ser administrada en los animales.

6.3.1. Estudio Histopatológico.

Posteriormente se realizó el diagnóstico histopatológico de cada uno de los órganos que se observaron, en las necropsias. Los estudios histopatológico se realizaron en la UNAM, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en el Departamento de Histopatología, las observaciones de cada uno de los órganos analizados, para cada uno de los compuestos, analizados tanto de la primera

como de la segunda etapa; se muestran en las siguientes tablas (Tablas 20, 21 y 22):

Tabla 20. Observaciones Histopatológicas.

Compuesto	Descripción Macroscópica	Descripción Microscópica	Imagen del Hígado.
Agua	Pulmón, Corazón, Hígado, Bazo y Riñón: Sin alteraciones evidentes.	Hígado: Algunos hepatocitos exhiben vacuolas de diferentes tamaños en el citoplasma. Bazo: Se aprecian numerosos megacariocitos. Secciones de pulmón, corazón y riñón: Sin cambios patológicos aparentes.	
Aceite de Ricino	Pulmón, Corazón, Hígado, Riñón y Páncreas sin cambios patológicos evidentes.	Hígado: se observa discreta proliferación de conductos biliares. Algunos hepatocitos de la región centrolobulillar muestran binucleaciones, megalocitosis y fina vasculización del citoplasma. Hay necrosis multifocal y discretos agregados de linfocitos. Pulmón: Se aprecia congestión difusa. En algunas regiones se observa engrosamiento de los septos. Corazón, riñón y páncreas se muestran sin cambios histomorfológicos.	
Brij56	Pulmón, Corazón, Hígado, Riñón y Páncreas sin cambios patológicos evidentes.	Hígado: se observa discreta proliferación de conductos biliares. Algunos hepatocitos de la región centrolobulillar muestran binucleaciones y vacuolas de diferentes tamaños en el citoplasma. Hay necrosis multifocal y discretos agregados de linfocitos. Riñón: Se aprecia congestión difusa. Corazón, pulmón y páncreas sin cambios morfológicos significativos.	
Isopropanol	Hígado, pulmón, corazón, bazo, riñón y glándula adrenal: Sin alteraciones macroscópicas.	Hígado: Algunos hepatocitos muestran binucleaciones y vacuolas de diferentes tamaños en el citoplasma, principalmente en la región centrolobulillar. Hay discretos agregados de neutrófilos alrededor de triadas portales. Riñón: Se aprecia congestión difusa, así como discreta área de hemorragia en la unión córtico-medular. Bazo: Sobre la cápsula se aprecia escaso material fibrilar eosinofílico. También se aprecian numerosos megacariocitos. Pulmón: En los espacios alveolares se observan escasos macrófagos; en la luz de algunos vasos sanguíneos se aprecian eritrocitos entremezclados con fibrina y adheridos al endotelio de los mismos. Secciones de corazón y glándula adrenal: Sin cambios histológicos significativos.	

Los resultados del estudio histopatológico, que se muestran en la tabla 20, describen para el caso del aceite de ricino, que al administrar este compuesto,

produce un aumento de bilis, con el fin de disolver o facilitar la digestión del aceite de ricino, por lo que hay un incremento en los conductos biliares, en el hígado. En cuanto a la necrosis multifocal, puede deberse a una deshidratación propiciada por el mismo aceite en ciertos lugares del hígado o debido a una disminución de oxígeno producida por una interrupción en el flujo de la sangre. Con respecto a la congestión difusa en pulmones, ésta es provocada por un aumento de sangre en el lado venoso del sistema circulatorio debido a un impedimento súbito del flujo de sangre del corazón a los pulmones lo que produjo un ataque cardio-respiratorio; esto es propiciado por el método de eutanasia (dislocación cervical).(50)

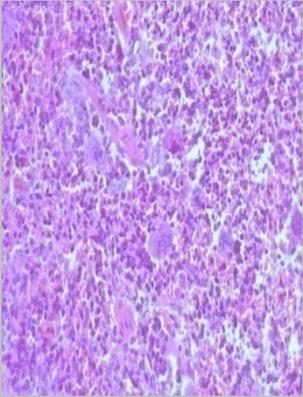
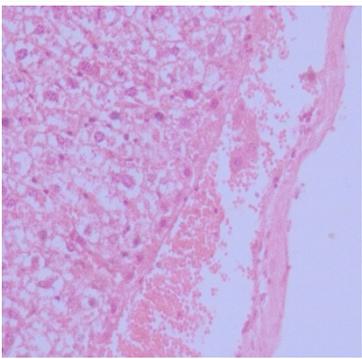
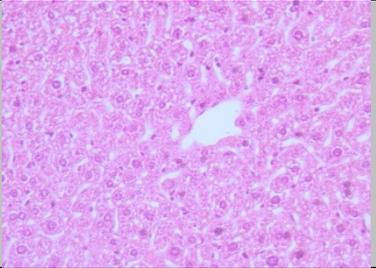
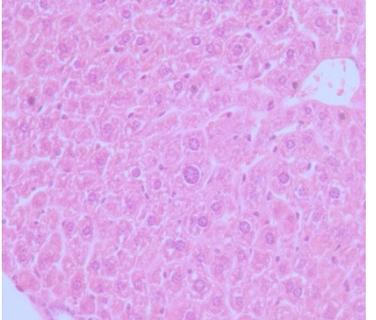
El Brij56 al igual que con el aceite de ricino existe una gran segregación de bilis por lo que hay una proliferación de conductos biliares para tratar de metabolizar este compuesto; la congestión en riñones es debida a un ataque cardio-respiratorio, propiciada por lo anteriormente mencionado (eutanasia).

El Isopropanol es un compuesto que presenta una DL_{50} al ser administrado por vía oral a una dosis de 3600mg/Kg y por vía dérmica tiene una DL_{50} de 1600 mg/Kg; nuestra dosis más alta es de 3000mg/Kg por vía intraperitoneal, y por esta vía de administración no hubo porcentaje de mortalidad, sólo presentaron una muy grave irritación y una disminución respiratoria, sin embargo después de 24 horas se restablecieron con normalidad; lo cual puede deducirse, dado que los hepatocitos presentan binucleaciones lo cual nos habla de una normal multiplicación de éstos.(51)

La cantidad de megacariocitos encontrados en el bazo; es una presencia normal en este órgano, porque éste es un órgano que está constituido por tejido hematopoyético y los megacariocitos son células abundantes en este tipo de tejidos.(50)

La congestión difusa en pulmones, es causada por el aumento de sangre en el lado venoso del sistema circulatorio debido a un impedimento súbito del flujo de sangre del corazón a los pulmones; lo cual es causado por el método de eutanasia, el cual propicia un ataque cardio-respiratorio, lo que da explicación a la congestión difusa en riñones y pulmones.(50)

Tabla 21. Observaciones Histopatológicas. Anotaciones para la ivermectina, ácido poliláctico, policaprolactona y pluronic F-127.

Compuesto	Descripción Macroscópica	Descripción Microscópica	Imagen
Pluronic	<p>Hígado: El parénquima es café claro con discretas áreas café rojizas. La superficie de corte presenta la misma coloración.</p> <p>Bazo: En la cápsula se observan discretas áreas blanco opacas pequeñas y el resto es rojo brillante.</p> <p>Pulmón, corazón y riñón: Sin cambios evidentes.</p>	<p>Hígado: La cápsula se observa discretamente engrosada debido a la proliferación de fibrina, tejido conectivo fibroso y escasos neutrófilos. Algunos hepatocitos muestran núcleo picnótico y binucleaciones, así como vacuolas de diferentes tamaños en el citoplasma, principalmente en la región centrolobulillar. Hay discretos agregados de neutrófilos alrededor de triadas portales.</p> <p>Bazo: Sobre la cápsula se aprecia escaso material fibrilar eosinófilico. También se aprecian numerosos megacariocitos.</p> <p>Secciones de pulmón, corazón y riñón: Sin cambios histomorfológicos aparentes.</p>	
Ivermectina	<p>Hígado: El parénquima es café claro con discretas áreas café rojizas. La superficie de corte presenta la misma coloración.</p> <p>Pulmón: El parénquima pulmonar es café claro entremezclado con áreas rosa pálidas. Al corte se aprecia la misma coloración.</p> <p>Corazón, bazo y riñón: Sin cambios aparentes.</p>	<p>Hígado: La mayoría de los hepatocitos muestran vacuolas de diferentes tamaños en el citoplasma, principalmente en la región centrolobulillar; en algunas zonas se aprecian hepatocitos binucleados. Hay hemorragias multifocales.</p> <p>Bazo: Se observa discreta despoblación de tejido linfóide, siendo evidente en los centros germinativos. También se aprecia moderada cantidad de megacariocitos.</p> <p>Secciones de pulmón, corazón y riñón: Sin cambios patológicos aparentes.</p>	
PLA	<p>Pulmón, corazón, hígado, bazo y riñón: Sin cambios patológicos evidentes.</p>	<p>Hígado: Los hepatocitos que se encuentran en la región centrolobulillar exhiben vacuolas de diferentes tamaños en el citoplasma.</p> <p>Bazo: Se observan escasos megacariocitos.</p> <p>Secciones de pulmón, corazón y riñón: Sin alteraciones histológicas.</p>	
PCL	<p>Pulmón, corazón, bazo, hígado y riñón: Sin cambios evidentes</p>	<p>Hígado: Los hepatocitos muestran vacuolización del citoplasma, principalmente en la región centrolobulillar.</p> <p>Bazo: Sobre la cápsula se aprecia escaso material fibrilar eosinófilico; entremezclados con el tejido linfóide, hay moderada cantidad de megacariocitos.</p> <p>Secciones de pulmón, corazón y riñón: Sin alteraciones histomorfológicas.</p>	

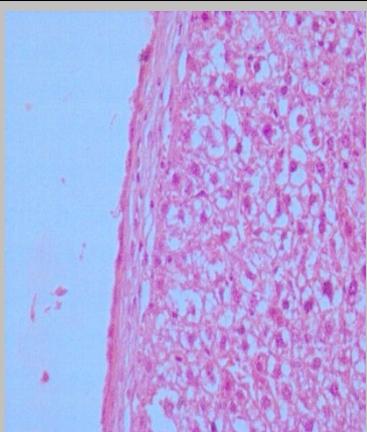
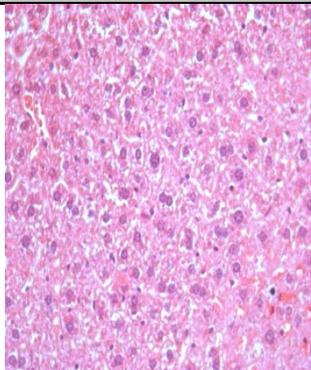
Los resultados de la tabla 21 muestran que el pluronic presenta pocas células con núcleo pinóctico, este tipo de núcleo se presenta, en altos niveles cuando hay una respuesta a lesión o daño celular, aunque en este caso no fue así; por lo que se puede establecer que no hubo daño celular. Con respecto al bazo los megacariocitos son células normales en este tipo de órgano; ya que como se ha dicho antes este órgano presenta funciones hematopoyéticas.(51)

La ivermectina es un fármaco que en mayor cantidad es metabolizado en el hígado, y al observarse las células de este órgano no se aprecia daño alguno; aunque hay pequeñas hemorragias multifocales, éstas no se le pueden atribuir a este compuesto. En cuanto al bazo no se observó nada fuera de lo normal.(50)

El ácido poliláctico (PLA) y la policaprolactona (PCL); no causan daño alguno a nivel celular en los órganos que se analizaron, la vacuolización se puede presentar por dos causas, la primera debida a un almacenamiento de sustancias de reserva, y la segunda causa sería por el almacenamiento de sustancias tóxicas; si la presencia de la vacuolización fuera debida al almacenamiento de una sustancia tóxica, se presentarían algunas células muertas en algunas regiones; esto debido a que dicha vascularización impediría el desarrollo normal de la célula, pero como éste no es el caso se puede concluir que no existe daño alguno propiciado por estos compuestos.

En la tabla 22, que se muestra a continuación, se muestran los resultados histopatológicos de las nanopartículas con NaCl y PEG.

Tabla 22. Observaciones Histopatológicas. Anotaciones para las Nanopartículas con NaCl y nanopartículas con PEG.

Compuesto	Descripción Macroscópica	Descripción Microscópica	Imágenes.
Nanopartículas con NaCl	Pulmón, corazón, hígado, bazo y riñón: Sin cambios patológicos evidentes.	Hígado: La cápsula se observa discretamente engrosada debido a la proliferación de fibrina. La mayoría de los hepatocitos muestran vacuolas de diferentes tamaños en el citoplasma. Se observa en algunas zonas con proliferación de hepatocitos, los cuales están rodeados por escaso tejido conectivo fibroso; algunos exhiben binucleaciones, hay discretas hemorragias multifocales y escasos agregados de linfocitos. Bazo: Sobre la cápsula se aprecia escaso material fibrilar eosinofílico. También se aprecian numerosos megacariocitos. Secciones de pulmón, corazón y riñón: Sin cambios patológicos aparentes.	
Nanopartículas con PEG	Hígado: El parénquima es café claro con discretas áreas café rojizas. Al corte, se observa la misma coloración. Pulmón, corazón, bazo y riñón: Sin cambios patológicos evidentes.	Hígado: Algunos hepatocitos exhiben vacuolas de diferentes tamaños en el citoplasma, principalmente en la región centrolobulillar. Hay discretos agregados de linfocitos alrededor de triadas portales. Bazo: Sobre la cápsula se aprecia escaso material fibrilar eosinofílico; entremezclados con el tejido linfoide hay moderada cantidad de megacariocitos. Secciones de pulmón, corazón y riñón: Sin cambios histomorfológicos.	

Al igual que en los compuestos anteriormente mencionados, no existe nada que nos haga pensar en alteraciones por daño celular causadas por la aplicación de estos compuestos; así como tampoco se podría mencionar alguna diferencia entre la administración de estas nanopartículas y algún daño en particular a nivel celular.

VII. Conclusiones.

Se obtuvieron las nanopartículas, mediante la técnica de microemulsión por fusión; con un tamaño aproximado de 200 nm y con un potencial zeta de -25mV.

Los termogramas nos ayudaron para la identificación del PEG, del tensoactivo retirado y para identificar la interacción de la PCL con la ivermectina.

Se establecieron las condiciones de liofilizado en las cuales se pueden obtener las nanopartículas secas.

Se determinó la efectividad de las nanopartículas en larvas de garrapatas ***Bophilus microplus*** mediante las técnicas de Shaw y la de Stone.

No se pudo concluir si la alta efectividad de las nanopartículas se debió a un efecto sinergista de alguno de los componentes, por no poder llevarse a cabo un duplicado de pruebas.

Los perfiles toxicológicos en los cuales se observó alta toxicidad, fueron los pertenecientes al Brij56 y del Aceite de Ricino, para las dosis por arriba de 300mg/mL.

Los demás componentes de las nanopartículas no presentan toxicidad en mamíferos.

En los estudios histopatológicos no se muestra daños a nivel celular, en ninguno de los órganos analizados.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Corporacion Colombiana de Investigación Agropecuaria. Parásitos en la Ganadería. Buscador: Google Octubre 2008. Diseño de Estrategias de Control para Ecto, Endo y Hemoparasitos en Bovinos del Departamento del Guaviare; www.indiceagropecuario.com/ganaderia/farmacologicos/agrocasas.
2. Bayer. Manual Bayer de la Garrapata. Buscador: Google Septiembre 2008. http://www.bayersanidadanimal.com.mx/index.php?art_id=89&categ=80&expand=2/9/80&file=view_article.tp.
3. Rodríguez R., Rosado A., Basto G., Sotero Z., Rosario R., Fragoso H. Manual Técnico para el Control de Garrapatas en el Ganado Bovino. INIFAP, editor. México, D.F.: Publicación Técnica; 2006.
4. Sánchez H. Control de la Garrapata. Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal DAGSA, CONASAG, SAGAR; 2007.
5. Bravo M., Coronado A. y Heriquez H. Susceptibilidad de Larvas y Adultos de *Boophilus microplus* al Ixodida Coumafos en Explotaciones Lecheras del Estado Lara, Zootecnia Venezuela. 2008; 26:41-46.
6. Soberanes N., Santa M., Fragoso H., García Z. Primer caso de Resistencia al Amitraz en la Garrapata del Ganado *Boophilus microplus* en México. Tecnología Pecuaria. 2002; 40:81-92.
7. Noguera A. Evaluación de Eficacia de Acaricidas Comerciales ante la Cepa de Campo *Boophilus microplus*. Managua, Nicaragua. Universidad Centroamericana; 1999.
8. Geary T. Ivermectin 20 years on: maturation of a wonder drug. Trends in Parasitology. 2005; 21:530-532.
9. Borges F., Silva H., Santos E., Oliveira G., Costa A. Pharmacokinetics of a New Long Acting Endectocide Formulation Containing 2.25% Ivermectin and 1.25% Abamectin in Cattle. Veterinary Parasitology. 2008:299-307.
10. Garcia Salas Cl. Obtencion de nanoparticulas de poliε-caprolactona (PCL) e Ivermectina Modificadas con Polietilenglicol (PEG) 6000 y su Evaluacion en el Proceso de Fagocitosis. México, UNAM; 2007.
11. Pérez L., Palma C., Villegas R., Vega M., Pérez R. Metodología Analítica y Detección de Residuos de ivermectina en Muestras de Leche de Rebaños de la Provincia de Ñuble, Chile. Medicina Veterinaria. 2006; 38:143-9.
12. Borges F., Buzzulini H., Soares C., Santos V., Oliveira E., Costa G. Endectocide activity of a new long-action formulation containing 2.25% ivermectin + 1.25% abamectin in cattle. Veterinary Parasitology. 2008; 155(3-4):299-307.
13. Rothen-Weinhold A, Gurny R, Dahn M. Formulation and technology aspects of controlled drug delivery in animals. Pharmaceutical Science and Technology Today. 2000;3(7):222-31.
14. Errecalde J. El Futuro de los Endectocidas: Perspectivas Tecnológicas. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional de La Plata.; Buscador: Google Octubre 2002. http://www.incam.com.ar/futuro_endectocidas.htm.
15. Escobar J., Garcia D., Zaldivar D., e Issa Katime. Hidrogeles. Principales Características en el diseño de sistemas de Liberación Controlada de Fármacos. Revista Iberoamericana Polímeros. 2002;3:5-25.

16. Domingo C., Fraile J., Fanovich M. Utilización de la Tecnología de Fluidos Supercríticos para la Impregnación de Biomateriales con Fármacos. Buscador: Google Octubre 2002. http://www.icmab.es/materials/fanovich/farmacos_resumen.html.
17. Garcia Gonzalez L. Obtencion y Caracterizacion de Nanoparticulas Solidas Lipidicas de Norfloxacin a partir de Microemulsiones por dos Tecnicas Diferentes. México; UNAM.; 2006.
18. Sáez V., Estibaliz H., Sanz L. Sistemas de Liberación Controlada de Medicamentos. Revista Iberoamericana de Polímeros. 2002 Julio de 2002.
19. Aulton M. Farmacia: Ciencia y Diseño de Formas Farmaceuticas. Elsevier, Madrid.2004. pags 23-27.
20. Swarbrick J. Drug Delivery: Controlled Release. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Third edition 2007. Informa Healthcare USA p. 1082.
21. Diana D., Gómez M., Fernández D., Núñez L. Microesferas Biodegradables de Liberación Controlada para Administración Parenteral. Revista Cubana de Farmacia. 2000;34.
22. Montaner I. Boletín de Información Farmacoterapéutica de Navarra. In: Osasunbidea SNdS, editor. Formas Farmacéuticas de Liberación Modificada y Estereoisómeros Nuevos Principios Activos Autorizados en el año 2003. Pamplona. pag. 9.
23. Esquivel J. Liberación Controlada de Ixodidas de uso Veterinario. Aspectos Tecnológicos. México; UNAM.; 2007.
24. Murillo M., Prior S., Vitas A., Renedo M., Goñi M., Irache J., Gamazo C. Liberación Controlada de Principios Activos Mediante el Empleo de Formulaciones Galénicas. Revista Medica de Universidad de Navarra. 2001; 45.
25. Bernad Ma. J., Melgoza L., Quintanar D. Sistemas de Liberación Controlada de Activos Farmacéuticos. México: Asociación Farmacéutica Mexicana A.C., 2003.3: 222-220
26. Shipway A. Historical Origins of Dendrimers. Buscador: Google 2009 Febrero <http://www.ninger.com/dendrimer/one.htm>.
27. Hoffmann R. Nuevas Moléculas que Parecen árboles o una Explosión de Fuegos Artificiales. Buscador: Google 2009 Enero <http://hosting.udlap.mx/profesores/miguela.mendez/alephzero/archivo/historico/az32/dendrimerhoffman.html>.
28. Pierigè F., Rossi L. Magnani M. Cell-based drug delivery. Elsevier ScienceDirect. 2008:286-295.
29. Wolfgang M. Solid Lipid Nanoparticles Production, Characterization and Applications. Advanced Drug Delivery. 2001;47:165-96.
30. Yáñez J., Salazar A., Chaires L., Jiménez J., Márquez M., Ramos E. Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. Avance y Perspectiva. 2002 Septiembre- Octubre.
31. Paul H., Román C., Harper T. Nanoparticles: Científica; 2003. Vol 3: 30-31
32. Dittoa A., Stephanie T., Yang H. Nanospheres formulated from l-tyrosine polyphosphate as a potential intracellular delivery device. Pharmaceutical Nanotechnology. 2009 6 October 2008:199-206.
33. Charles P. Poole F. Introducción a la nanotecnología. Editado por REVERTE Editorial S.A. Barcelona, 2007. pags 10-79
34. William J. Znidarsic I., Prasad S. Z-potential Characterization of Collagen and Bovine Serum Albumin Modified Silica Nanoparticles: a Comparative Study. Science Business Media. 2009;44:1374-80.
35. Inc. Zeta-Meter. Potencial Zeta: Un Curso Completo en 5 Minutos. Buscador: Google 1998. <http://www.zeta-meter.com/redchile.pdf>

36. Polymer Science Learning Center. Differential Scanning Calorimetry. Buscador: Google 2008 junio; <http://pslc.ws/macrog/dsc.htm>
37. Pope D., Wilkinson P., Egerton J., Conroy J. Oral Controlled-Release Delivery of Ivermectin in Cattle Via an Osmotic Pump. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1985;74(10):1108-10.
38. Soll M., Carmichael I., Gross S. Control of Induced Infestations of Adult *Amblyomma Hebraeum* with Sustained Release Ivermectin. *Journal of Veterinary Research*. 1987;54(1):17-20.
39. Taylor S., Kenny J. An Ivermectin Sustained Release Bolus in Cattle: Its Effects on the Tick *Ixodes Ricinus*. *Medical and Veterinary Entomology*. 1990;4(2):147-50.
40. Maeda H., Brandon M., Sano A. Design of Controlled-Release Formulation for Ivermectin Using Silicone. *International Journal of Pharmaceutics*. 2003;261(1-2):9-19.
41. Stela R., Rolim V., Eifler V., Gilsane P., Sarda V. Acaricidal activity of limonene, limonene oxide and b-amino alcohol derivatives on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*. 2008:149-53.
42. Guglielmone A., Mangold A., Castelli M., Aguirre D., Cafrune M., Cetrá B. Toxicidad de la Cipermetrina para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y del Diazinón para *Haematobia irritans* en la Argentina. *Revista Invención Agropecuaria*. 2006 Abril 2006;35:31-41.
43. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-006-ZOO-1993, Requisitos de Efectividad Biologica para los Ixodídeos de Uso en Bovinos y Metodo de Prueba., (1993).
44. EPA. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.1100 Acute Oral Toxicity. In: United States Prevention PECaTSAEP, editor. Washington. 2002. p. 1-33.
45. Xian C., Ling G., Guo C., Yang Z., Ying G., Mei H., Ji W., Yi F., YuQuan W., JianPing C., MingJing T. Acute oral Toxicity Evaluation of Biodegradable and pH-sensitive Hydrogel Based on Polycaprolactone, Poly(ethylene glycol) and Methylacrylic acid (MAA). *Journal of Biomedical Materials*. 2007:549-97.
46. Enviado por Carrasquilla, Maigo y otros Autores. *Anatomia Patologica - Shock*. 2003. Buscador: Google 2009 mayo <http://www.revistaciencias.com/publicaciones/EpyFIEAEyYAeVYLvf.php>.
47. R. Felmer. Estudio histopatológico de hígado y riñón de caninos y su relación con las concentraciones de urea, creatinina, proteínas, enzimas (ALT y SAP). Buscador: Google 2009 junio; 2003). <http://www.monografias.com/trabajos904/estudio-histopatologico-caninos/estudio-histopatologico-caninos2.shtml>.