



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“POLÍMEROS DE IMPRESIÓN COMO  
SISTEMAS PARA EVITAR EL DAÑO DE  
LA IVERMECTINA AL MEDIO  
AMBIENTE”**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A  
VICTOR MANUEL CANSECO PEREZ

MÉXICO, D.F.

2011





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** JESÚS GRACIA MORA

**VOCAL:** MARÍA JOSEFA BERNAD BERNAD

**SECRETARIO:** ABRAHAM FAUSTINO VEGA

**1er. SUPLENTE:** EFREN HERNANDEZ BALTAZAR

**2° SUPLENTE:** LORENA GARCIA GONZALEZ

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 100 del Departamento de Química Inorgánica, Unidad de Posgrado, Edificio B, Facultad de Química, UNAM. Ciudad Universitaria.

**ASESOR**

**SUSTENTANTE**

---

**Dr. Jesús Gracia Mora**

---

**Victor Manuel Canseco Pérez**

---

---

## DEDICATORIAS

*A mis papás Julia y Enrique que me dieron su apoyo y comprensión para poder concluir esta etapa de mi vida, por todo el esfuerzo que implico para ellos darme lo necesario para llegar a este momento.*

*A mi hermana que fue un gran apoyo para poder concluir este trabajo.*

*A mis padrinos por los valiosos consejos que me brindan y por todo lo que he aprendido de ellos.*

*A Anayeli Sánchez por darme su amistad y cariño, por todos los momentos que pasamos juntos en la facultad y por el apoyo para poder terminar este trabajo.*

*A mis amigos de la facultad, por todos esos momentos que jamás olvidare.*

---

---

## AGRADECIMIENTOS

*A la UNAM por el privilegio de formarme en su aulas, por los conocimientos adquiridos a través de mis profesores.*

*Al Dr. Jesús Gracia Mora por ser mi asesor de tesis y brindarme su apoyo y confianza para poder realizar este trabajo.*

*A la Dra. María Josefa Bernard por su sugerencias para realizar la parte experimental, por sus observaciones y sugerencias a este trabajo.*

*Al MVZ Aldo Alberti Navarro por su apoyo en la parte experimental, al proporcionarme los borregos para poder realizar la evaluación in vivo.*

*A los compañeros del CEPICSA, Eduardo Martin, Omar Baño, Juan de Dios y Karin Nicole por su ayuda para realizar la evaluación in vivo y para obtener la muestras.*

*A la Dra. Yazmín Alcalá por su apoyo y asesoría para realizar el bioensayo en escarabajos.*

*A mis compañeros del laboratorio de 100, por todos los momentos divertidos que pasamos.*

*Al Dr. Abraham Faustino por su amable disposición para la revisión del trabajo.*

ABREVIATURAS

AIBN: 2,2'-azobisisobutironitrilo.

CL50: concentración letal media. Concentración de una sustancia que produce la muerte al 50% de los animales expuestos.

dpd: Días post-deposición.

dpt: Días post-tratamiento.

DT50: Vida media de degradación de un fármaco.

GABA: Ácido gamma-Aminobutirico.

hpt: horas post-tratamiento.

L.A.: larga acción

MAA: Ácido metacrílico.

MIP: Polímero de impresión molecular.

MIP-IVM-UV: Polímero de impresión molecular de ivermectina, la polimerización se inicio con luz ultravioleta a 4°C.

NIP: Polímero no impreso.

NIP-UV: Polímero no impreso, la polimerización se inició con luz ultravioleta a 4°C.

NOEC: Concentración más alta de fármaco que no causa efecto (mortalidad, alteraciones de la reproducción, cambios comportamiento) en la población estudiada para un tiempo determinado.

PETA: Triacrilato de pentaeritrol.

TL50: Tiempo letal 50. Tiempo que transcurre hasta que el 50% de la población muere.

UV: Luz ultravioleta.

<b>ÍNDICE</b>	
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>3</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>3. ANTECEDENTES .....</b>	<b>7</b>
<b>3.1. Fármacos de uso veterinario en el medio ambiente .....</b>	<b>7</b>
<b>3.1.1. Impacto de los fármacos veterinarios en el medio ambiente .....</b>	<b>8</b>
<b>3.1.2. Principales rutas de liberación de fármacos de uso veterinario al medio ambiente .....</b>	<b>10</b>
<b>3.1.2.1. Persistencia en el suelo .....</b>	<b>11</b>
<b>3.1.2.2. Disipación de los fármacos en los suelos .....</b>	<b>12</b>
<b>3.1.2.3. Concentraciones de fármacos de uso veterinario en el suelo y en el estiércol de ganado tratado.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2. IVERMECTINA .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.1. Farmacocinética.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2.2. Riesgos de la ivermectina, excretada por el ganado previamente tratado, en el ambiente.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. Química supramolecular.....</b>	<b>25</b>
<b>3.3.1. Impresión molecular .....</b>	<b>26</b>
<b>3.3.1.2 Reconocimiento molecular.....</b>	<b>27</b>
<b>3.3.2. Polímeros de impresión molecular.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.2.1. Tipos de polímeros de impresión molecular.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3.2.2. Síntesis de polímero de impresión molecular .....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.3. Polimerización por radicales libres.....</b>	<b>34</b>
<b>3.4. Extracción de la molécula molde .....</b>	<b>34</b>
<b>3.4.1. Aplicaciones de los polímeros de impresión molecular.....</b>	<b>35</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>38</b>
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>39</b>
<b>5.1. Materiales y equipos.....</b>	<b>39</b>
<b>5.2. Metodología.....</b>	<b>40</b>
<b>5.2.1. Síntesis del polímero de impresión molecular.....</b>	<b>40</b>
<b>5.2.1.2. Síntesis del MIP-IVM-UV .....</b>	<b>40</b>
<b>5.2.1.3. Eliminación de la ivermectina de los polímeros.....</b>	<b>42</b>
<b>5.2.1.4. Carga de ivermectina en los polímeros .....</b>	<b>42</b>
<b>5.2.1.5. Sistema de administración del polímero <i>in vivo</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>5.3. Estudios de recuperación de ivermectina <i>in vivo</i>.....</b>	<b>44</b>

5.3.1. Administración del polímero .....	44
5.3.1.2. Recolección de muestras de heces .....	45
5.3.1.3. Efecto de la interacción polímero de impresión ivermectina contenidos en heces de borregos sobre los escarabajos .....	45
6. RESULTADOS .....	47
6.1. Síntesis del polímero impreso de ivermectina y el polímero no impreso ..	47
6.1.1. Eliminación de la ivermectina .....	48
6.1.2. Cargado de ivermectina en los polímeros.....	49
6.2. Administración del polímero e ivermectina, y recolección de la muestras de heces.....	50
6.3 Resultados terrarios 1 A, 2 B y 3 C.....	51
6.3.1. Efecto de la interacción polímero-ivermectina en heces de borrego sobre los escarabajos adultos .....	51
6.3.2. Efecto de la interacción polímero-ivermectina en heces de ganado sobre las larvas de escarabajo .....	57
6.3.3. Resultados terrarios 4 D NIP-UV, 5 E MIP-IVM-UV y 6 F CONTROL, permanencia del polímero en el tracto gastrointestinal del borrego. ....	61
6.3.3.1. Efecto de las heces de borregos tratados con ivermectina sobre los escarabajos adultos.....	61
6.3.3.2. Efecto de las heces de borregos tratados con ivermectina sobre las larvas de escarabajo.....	64
7. CONCLUSIONES.....	67
8. PERSPECTIVAS.....	69
9. BIBLIOGRAFÍA.....	70
10. ANEXO 1 .....	74



## 1. RESUMEN

En los últimos años las grandes cantidades de fármacos utilizadas por la industria ganadera, han generado preocupación de que sucede con éstos y sus metabolitos al ser excretados por heces u orina al medio ambiente en donde tienen contacto con la fauna del suelo y los organismos acuáticos. Los cuales podrían verse afectados al entrar en contacto con alguno de estos fármacos o sus metabolitos.

El grupo de los antiparasitarios ha sido uno de los más estudiados ya que tiene efectos sobre especies que no son blancos, en este grupo se encuentra la ivermectina que ha sido un antiparasitario ampliamente utilizado en el tratamiento de parásitos internos y externos que afectan al ganado, este fármaco se excreta principalmente en heces de manera inalterada por lo que se han realizado diversos estudios de los riesgos que representa para la fauna encargada de la degradación del estiércol del ganado; los resultados obtenidos muestran que los más afectados son las poblaciones de escarabajos estercoleros, moscas y lombrices.

Hasta al momento no se ha planteado una solución efectiva para este problema, los estudios se han centrado en la evaluación del riesgo que producen los fármacos que son excretados por heces u orina. En este trabajo se sintetizó una matriz polimérica conocida como polímero de impresión molecular (MIP). La cual es capaz de unirse a la ivermectina de forma específica, fuerte y eficiente. En principio se puede aprovechar la capacidad de reconocimiento molecular de este polímero, para hacer que en sistemas vivos, sustancias como la ivermectina no estén biodisponibles para la microfauna en el medio ambiente.

Tomando en cuenta lo anterior, se administró de forma oral el MIP a un grupo de borregos tratados previamente con ivermectina. Se utilizó un medicamento de larga acción (IVERGOLD 3.5 L.A.) el cual se aplicó por vía subcutánea. Se obtuvieron muestras de heces, esto con el fin de revisar que la ivermectina es

atrapada por el MIP en el tracto gastrointestinal y de esta manera se excrete en heces con el fin de disminuir su efecto nocivo sobre la fauna del suelo. Al mismo tiempo dos grupos de borregos fueron tratados con ivermectina a uno de los grupos se les administró el polímero no impreso, el otro grupo sirvió como control y no se le administró polímero.

Con las muestras de heces se realizaron bioensayos con escarabajos donde se evaluó si la interacción de la MIP-ivermectina disminuye el efecto nocivo del fármaco sobre los escarabajos, los resultados muestran que el polímero impreso disminuye el efecto nocivo de la ivermectina sobre la población de escarabajos, ya se que se observo una mayor supervivencia de los escarabajos expuestos a las heces de los borregos tratados con ivermectina y que se les administró el polímero impreso con respecto a los expuestos a muestras de heces de borrego a los que nos se les administro el MIP. En el bioensayo también se evaluó la supervivencia de las larvas en la cuales también se vio disminuido el efecto nocivo de la ivermectina cuando esta se encontraba atrapada por el MIP.

Por lo que los polímeros de impresión podrían ser utilizados para evitar el daño que provoca la ivermectina al ser excretada al ambiente.

## 2. INTRODUCCIÓN

El riesgo potencial asociado a la emisión de fármacos al medio ambiente ha comenzado a ser estudiado sobre todo para los fármacos utilizados en la medicina veterinaria, esto debido a las grandes cantidades utilizadas para el mantenimiento de la salud de los animales utilizados en la producción de alimentos de consumo humano, la mayoría de estos medicamentos son usados para prevención y no cura. Varios fármacos han sido detectados en todo en el mundo: en suelos, en heces de ganado, aguas superficiales y aguas subterráneas.

Los grupos más ampliamente estudiados han sido los antiparasitarios y los antibióticos, debido a que estos grupos presentan efecto sobre organismos no blanco; la fauna presente en los suelos, heces de ganado, aguas superficiales y aguas subterráneas puede verse afectada considerablemente si las cantidades de fármacos presentes en estos medios alcanzan concentraciones tóxicas.

Uno de los medios en donde los fármacos alcanzan concentraciones potencialmente tóxicas son las heces de ganado que previamente han recibido algún tratamiento<sup>1</sup>, esto debido a que muchos fármacos son excretados de manera inalterada, adicionalmente, se considera que los metabolitos excretados en la heces pueden tener actividad. El estiércol que contiene el fármaco, entra en contacto con el suelo de forma natural en el pastoreo o cuando se esparce para ser utilizado como abono; en el suelo las sustancias presentes en el estiércol pueden tener efecto sobre la fauna presente en el suelo. El fármaco puede permanecer en el medio ambiente por tiempos que van desde días hasta meses, esto depende de varios factores tales como temperatura, pH, tipo de suelo, carbono orgánico y la presencia de determinadas bacterias degradadoras<sup>2</sup>.

Los efectos producidos por la presencia de fármacos en el medio ambiente, han tomado importancia no sólo por afectar el equilibrio ecológico, si no también por que se ha estimado el valor económico que presenta la pérdida de

fauna que está implicada en procesos importantes para el mantenimiento de las tierras de pastoreo<sup>3</sup>.

La polímero de impresión en lo últimos años han sido utilizados en numerosas aplicaciones. Por ejemplo: como fase estacionarias en separaciones cromatográficas, para la purificación de compuestos<sup>4,5</sup>, como sensores para inmunoensayos y diagnósticos clínicos<sup>6</sup>, como sistemas de liberación modificada de fármacos<sup>7, 8</sup> y como sistemas para la remoción de sustancias en el cuerpo<sup>9,10</sup>. Esta última aplicación puede ser utilizada para atrapar fármacos que se eliminan principalmente en heces y que podrían producir efectos nocivos sobre el medio ambiente, el fármaco al encontrarse atrapado en el polímero será menos biodisponible por lo que su efecto tóxico disminuirá.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Fármacos de uso veterinario en el medio ambiente

Los medicamentos de uso veterinario son utilizados ampliamente en el tratamiento y prevención de enfermedades en los animales, también como aditivos en la alimentación para mejorar su crecimiento. Los fármacos empleados en los medicamentos para este uso incluyen varios grupos, en la tabla 1 se muestran los principales fármacos utilizados<sup>11</sup>.

En los últimos años ha tomado importancia los efectos que producen sobre el medio ambiente los fármacos utilizados en la ganadería, apicultura y acuicultura, debido a que se emplean grandes cantidades de estos fármacos; por ejemplo tan sólo en Europa, en la ganadería son utilizadas anualmente 2,500 toneladas de fármacos con fines terapéuticos<sup>12</sup>.

Tabla 1. Principales fármacos de uso veterinario <sup>11</sup> .		
Grupo	Clasificación química	Principio activo (fármaco)
<b>Antibacterianos</b>	Tetraciclinas	Oxitetraciclina, clortetraciclina y tetraciclina.
	Sulfonamidas	Sulfadiazina, sulfametazina y sulfatiazol.
	β- lactámicos	Amoxicilina, ampicilina, penicilina G y bencil penicilina
	Amino glucósidos	Dihidro estreptomycin, neomicina y apramicina
	Macrólidos	Tilosina, espiramicina, eritromicina y lincomicina
	Fluoroquinolonas	Enrofloxacina.
	2,4-diaminopirimidinas	Trimetroprim
	Pleuromutilinas	Tiamulina
<b>Antiparasitarios</b>	Macrolidos endectocidas	Ivermectina, doramectina y eprinomectina.
	Piretroides	Cipermetrina y deltametrina
	Organofosforados	Diazinon
	Pyrimidinas	Pirantel y morantel
	Benzimidazoles	Triclabendazol

## ANTECEDENTES

	Otros	Levamisol
<b>Hormonas</b>		Altrenogest
		Progesterona
		Medroxiprogesterona
		Benzoato de metil testosterona Estradiol
<b>Anti fúngicos</b>	Biguanida/gluconato	Clorhexidina
	Azoles	Miconazol
	Otros	Griseofulvina
<b>Coccidiostáticos/ antiprotozoarios</b>		Amprolio, clopidol, lasalocid, maduramicina, narasina, nicarbacina, robenidina, toltrazuril y diclazuril
<b>Promotores del crecimiento</b>		Monensina, salinomicina y flavofosfolipol
<b>Fármacos utilizados en la acuicultura</b>		Oxitretaciclina, amoxicilina, florfenicol, benzoato de emamectina, cipermetrina, teflubenzurón y peróxido de hidrogeno.
<b>Anestésicos</b>		Isoflurano,halotano, procaina y lidocaína
<b>Analgésico</b>		Eutanasia
<b>Tranquilizantes</b>		Fenobarbital
<b>Antiinflamatorios no esteroideos</b>		Fenilbutazona y caprofen
<b>Anti- flatulento</b>		Dimeticona y poloxalene

Varios de estos fármacos han sido evaluados para conocer su posible toxicidad sobre el medio ambiente.

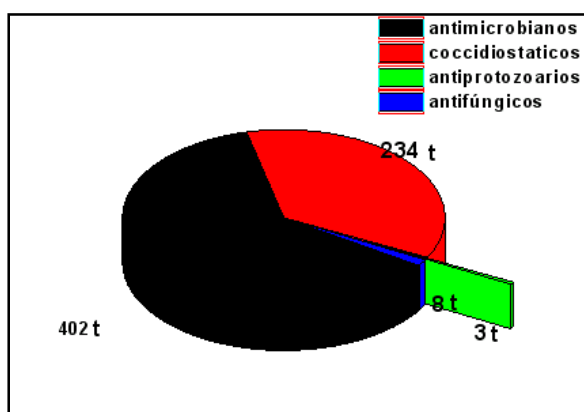
### 3.1.1. Impacto de los fármacos veterinarios en el medio ambiente

Es inevitable que durante el uso de los fármacos veterinarios éstos no entren en contacto con el medio ambiente terrestre y/o acuático, ya que varios fármacos como los antibióticos y antiparasitarios que al ser administrados son eliminados principalmente por las heces y/u orina, por lo que la entrada del fármaco al suelo es a través de la excreción y la posterior eliminación del estiércol y/u orina a la tierra.

El impacto de un fármaco de uso veterinario sobre el medio ambiente está determinado por una serie de factores que incluyen: la cantidad utilizada, los

intervalos de uso, la vía de administración, el metabolismo, su persistencia en el medio ambiente y su eco toxicidad<sup>13</sup>.

Las cantidades utilizadas de fármacos para mantener la salud del ganado son tales que han comenzado a ser consideradas como un riesgo para el medio ambiente. Tan sólo las ventas en el Reino Unido de tratamientos antimicrobianos, coccidiostáticos, antiprotozoarios y antifúngicos en el 2009 fueron (Gráfica 1): con las mayores ventas los antimicrobianos con 402 toneladas, seguido de los coccidiostáticos con 234 toneladas; los antiprotozoarios y antifúngicos tuvieron las menores ventas con 8 toneladas y 3 toneladas respectivamente<sup>14</sup>. Si bien se debe considerar que aún cuando un fármaco es utilizado en grandes cantidades puede no ser liberado al medio ambiente de manera significativa, influyen también otros factores.



Gráfica 1. Cantidades de antimicrobianos, coccidiostáticos, antiprotozoarios y antifúngicos (t: toneladas), vendidos en 2009 en el Reino Unido<sup>14</sup>.

La vía de administración es un factor importante para el efecto que pueda producir un fármaco sobre el medio ambiente, por ejemplo existen rutas por las cuales el fármaco llega directamente al suelo o a los cuerpos de agua (ríos, lagunas, lagos y mares) como sucede con los medicamentos que son administrados vía tópica (baños o aspersión) para tratar infecciones de parásitos externos en el ganado. En este caso el fármaco no sufre ningún tipo de metabolismo por lo que es liberado de manera inalterada al medio ambiente.

### **3.1.2. Principales rutas de liberación de fármacos de uso veterinario al medio ambiente**

La liberación del fármaco puede darse tanto de forma directa e indirecta<sup>15</sup>. La liberación directa se da por ejemplo en la cría de peces donde el fármaco es aplicado en el agua o bien en los tratamientos tópicos principalmente en baños de inmersión donde varias sustancias son utilizadas externamente en los animales para el tratamiento de parásitos externos o infecciones<sup>11</sup>. En este tipo de aplicaciones los productos veterinarios pueden contaminar el suelo y los cuerpos de agua ya que llegan de manera directa a estos sitios. Mientras que la vía indirecta se da cuando se esparce estiércol del ganado que fue tratado con algún fármaco, además debido a que algunos fármacos tienen un pobre metabolismo, prácticamente éstos se excretan en heces (estiércol) u orina de manera inalterada independientemente de la vía de administración<sup>15</sup>, muchos fármacos que son metabolizados pierden su actividad farmacológica, por lo tanto al ser excretados en heces u orina no tienen impacto sobre el medio.

Los fármacos utilizados en veterinaria se pueden incorporar al medio ambiente por otras vías, como lo es durante su producción; aunque esta contribución es baja en los países donde la fabricación está sujeta a fuertes controles, también pueden incorporarse al medio ambiente durante la eliminación del fármaco no utilizado y envases que contengan el producto por ejemplo: estiércol, pescado, agua y equipos para su administración<sup>11</sup>.

Actualmente la evaluación del riesgo al medio ambiente se refiere a la emisión de los fármacos a partir del uso del producto (administración y excreción)<sup>16</sup>. La vía indirecta es un ejemplo en el que se evalúa lo que sucede con los fármacos utilizados en el tratamiento del ganado, al ser eliminados por heces u orina. En este caso toman interés las diferencias en el metabolismo de un fármaco, algunos de los fármacos usados en el ganado tienen un metabolismo pobre y por lo tanto se excretan en las heces u orina de manera inalterada



produciendo un mayor efecto nocivo que los fármacos que sufren un extenso metabolismo.

Generalmente los residuos de los animales (heces y orina) se utilizan como abono en los pastos que se utilizan para criar ganado al aire libre, en consecuencia, los residuos de fármacos en las heces u orina de los animales deben ser considerados al evaluar los potenciales efectos ambientales del uso de medicamentos veterinarios en la ganadería.

### 3.1.2.1. Persistencia en el suelo

Después de la incorporación, la principal ruta de degradación de los fármacos veterinarios presentes en el suelo es la biodegradación aeróbica, la degradación de los fármacos depende de sus vidas medias de degradación (DT50) que van desde días (d) a meses y se ve afectada por las condiciones ambientales tales como temperatura, pH, tipo de suelo, carbono orgánico, las condiciones de nutrientes y la presencia de determinadas bacterias degradadoras. Por ejemplo, se ha demostrado que el organofosforado diazinón se degrada rápidamente en suelos húmedos (DT50= 1.7 d) mientras que es muy persistente en suelos arenosos (DT50= 88 a 112 d)<sup>2</sup>. Los estudios de los efectos de la temperatura sobre la degradación de la ivermectina demostraron que las condiciones ambientales afectan la vida media, por ejemplo en invierno el intervalo de DT50 es de 91 a 217 d, mientras que en el verano se degrada con mayor rapidez con vidas medias de degradación que van desde 7 hasta 14 d<sup>17</sup>.

Tabla 2. Persistencia de algunos medicamentos veterinarios en el estiércol <sup>2</sup> .			
Grupo Químico	Compuesto	Matriz	DT 50 (d)
<b>Macrólido</b>	Tilosina	Estiércol de cerdo	<2
	Eritromicina	Estiércol	41
	Rocitromicina	Estiércol	130
<b>Macrólido endectocida</b>	Ivermectina	Estiércol de ganado	>45
	Sulfa cloro piridazina	Heces de pollo	<8
	Sulfa cloro piridazina	Heces de pollo (liquida)	<90
	Sulfa cloro piridazina	Estiércol de cerdo	>8
<b>Tetraciclinas</b>	Cloro tetraciclina	Heces de pollo + tierra	>30
	Oxotetraciclina	Estiércol de ganado	<30

## ANTECEDENTES

Amprolium	Heces de pollo	>8
Amprolium	Heces de pollo (liquida)	>90
Nicarbazina	Heces de pollo	>8
Salinomicina	Estiércol líquido	6
Tiamulina	Estiércol líquido	>180

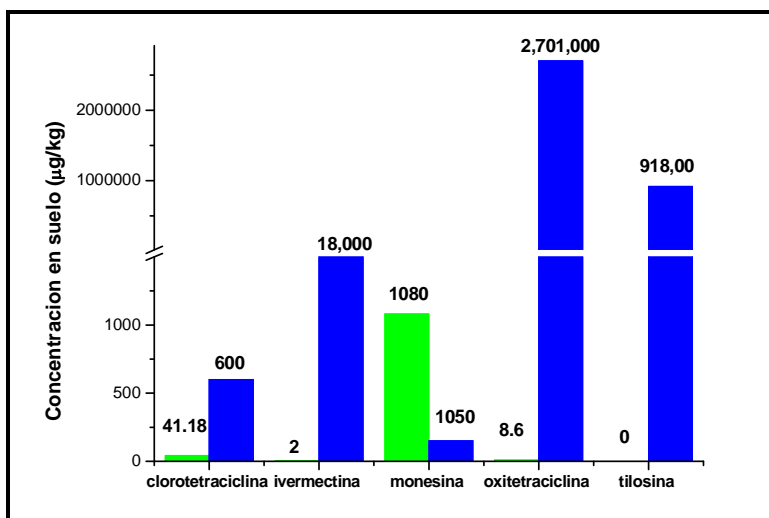
Los datos disponibles sobre la persistencia en el estiércol de una serie de fármacos veterinarios de uso común se muestran en la tabla 2. Los datos son variados, por ejemplo para las sulfonamidas, aminoglucósidos,  $\beta$ -lactámicos y macrólidos, tienen una vida media de 30 días o menos, por el contrario el macrólido endectocida ivermectina y las tetraciclinas tienen vidas medias más prolongadas. El grado en que los medicamentos pueden adsorberse en los suelos es muy variable. En consecuencia su movilidad también varía ampliamente, debido al hecho de que varios fármacos pueden encontrarse en su forma iónica en el intervalo de pH de los suelos naturales, por lo tanto un fármaco puede estar en el suelo como especie negativa, neutra o cargada positivamente, dependiendo del estado de ionización las interacciones con el suelo pueden ocurrir a través de atracción electrostática, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas. El comportamiento de adsorción también se ve influida por las propiedades del suelo las cuales incluyen pH, contenido de carbono orgánico, metales, la fuerza iónica y la capacidad de intercambio catiónico, también la adsorción se ve alterada por el tipo matriz en la cual el fármaco es liberado al medio ambiente.

### 3.1.2.2. Disipación de los fármacos en los suelos

Cuando un fármaco de uso veterinario llega al suelo, también puede llegar a las aguas superficiales o las aguas subterráneas. Con el tiempo la mayoría de los compuestos se disipa de las capas superiores del suelo, por ejemplo la disipación de los antibióticos de uso veterinario en el suelo pueden ser de diversas maneras: debido a la biodegradación en el suelo, a la mezcla con abonos que se esparce después en tierras de cultivo, a la hidrólisis química, descomposición química en general y a la retención en el suelo por los procesos de sorción o el transporte a otro compartimento ambiental<sup>11</sup>.

### 3.1.2.3. Concentraciones de fármacos de uso veterinario en el suelo y en el estiércol de ganado tratado

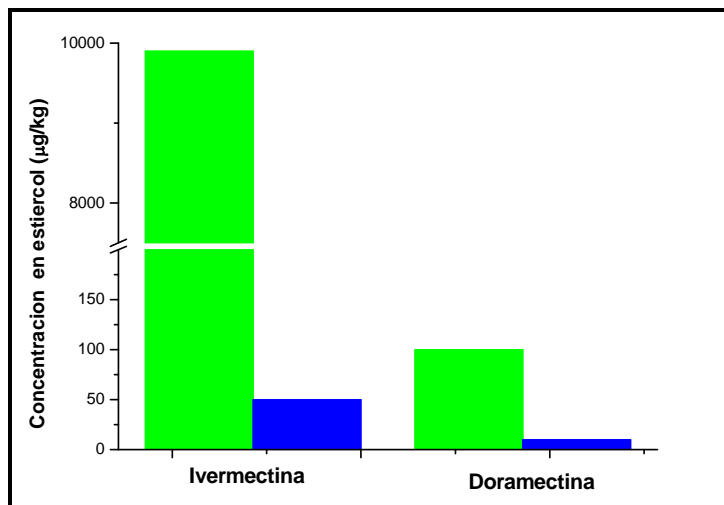
La concentración de un fármaco en el suelo puede ser muy variada y dependiendo de ésta y su actividad puede representar un peligro. Una comparación de las concentraciones de fármacos de uso común en veterinaria encontradas en el suelo y las concentraciones en la cual existe un efecto se muestra en la gráfica 2<sup>1</sup>. En donde se observan las concentraciones de algunos antiparasitarios y antibióticos, las barras verdes muestran las concentraciones que han sido cuantificadas en el suelo y las barras azules representan las concentraciones en las cuales los organismo se ven afectados por estos fármacos, se puede notar que sólo la monesina alcanza concentraciones en suelo que afectan a los organismos del suelo.



Gráfica 2. Concentraciones de fármacos en el suelo, las barras verdes representan las concentraciones cuantificadas en el suelo y las azules la concentración máxima inhibitoria para los organismos de prueba.<sup>1</sup>

Sin embargo, esto depende fuertemente del fármaco, de la vía de administración, y de la dosis utilizada. Boxall, Kolpin, Halling-Sorensen y Toll hicieron un estudio acerca de las concentraciones de ivermectina y doramectina en el estiércol, encontraron que rebasan la concentración a la cual

existe muerte de los organismos presentes en el estiércol como se observa en la gráfica 3<sup>1</sup>.



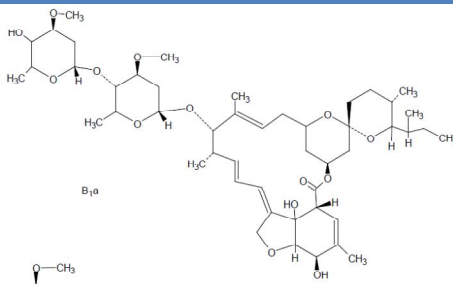
Gráfica 3. Concentraciones de ivermectina y doramectina en estiércol, las barras verdes representan las concentraciones cuantificadas en el estiércol y las azules la concentración máxima inhibitoria para los organismos de prueba. <sup>1</sup>

### 3.2. IVERMECTINA

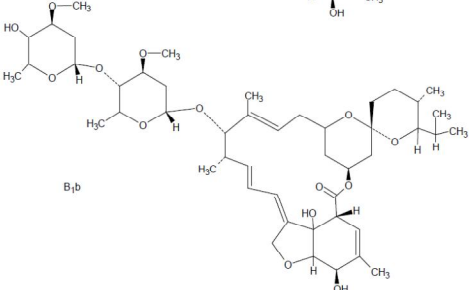
La ivermectina es un antiparasitario endectocida de uso veterinario, que actúa contra nemátodos y artrópodos que afectan al ganado, pertenece a la familia de la avermectinas las cuales son lactonas macrocíclicas aisladas de *streptomyces avermilitis*, la ivermectina está compuesta por un 80% de 22,23-dihidroavermectina B<sub>1a</sub> y 20% de 22,23-dihidroavermectina B<sub>1b</sub><sup>18</sup>.

La ivermectina bloquea la neurotransmisión, interfiriendo en las sinapsis neuromusculares. Actúa bloqueando los canales de cloro-glutamato, que son comunes en nematodos, insectos y garrapatas, paralizando así la faringe y los músculos somáticos. En los vertebrados estimula la liberación del ácido gamma-amino butírico (GABA) en las neuronas; pero como se encuentran en el cerebro y por lo tanto están protegidas por la barrera hematoencefálica, el fármaco es muy seguro para los mamíferos<sup>19</sup>. En la tabla 3 se muestra la estructura química y algunas propiedades de la ivermectina.

Tabla 3. Ivermectina	
<b>Peso molecular</b>	875.1 g/mol
<b>Punto de fusión</b>	155 °C
<b>Formula molecular</b>	C <sub>48</sub> H <sub>74</sub> O <sub>14</sub> (B <sub>1a</sub> ), C <sub>47</sub> H <sub>72</sub> O <sub>14</sub> (B <sub>1b</sub> )
<b>Solubilidad de agua</b>	4 mg/l
<b>Aspecto</b>	Cristales incoloros
<b>Espectro de absorción UV-visible</b>	Maxima: 237,245 y 253 nm



B<sub>1a</sub>



B<sub>1b</sub>

### 3.2.1. Farmacocinética

Se han desarrollado varias formulaciones que permiten la administración por diferentes vías (oral, tópica, subcutánea o intramuscular) dependiendo de la especie animal.

La ivermectina presenta una vida media de 36 horas (hrs), debido a su alta naturaleza lipofílica es ampliamente distribuida por lo que su volumen de distribución es muy alto: > 5.3 L/kg, con ligeras variantes en las diferentes especies. Tiende a acumularse en el tejido adiposo y los niveles más altos de ivermectina se encuentran en la grasa, bilis, hígado y la más baja en el cerebro; estudios en donde utilizaron como modelo experimental al perro, demostraron que se une ampliamente a la albúmina plasmática y a las lipoproteínas<sup>20</sup>. La ivermectina persiste durante un periodo prolongado, debido no sólo a la baja eliminación del plasma, sino también a la acumulación en los tejidos grasos.

La vía de administración y la formulación afectan en gran medida la farmacocinética de la ivermectina por ejemplo se han desarrollado formulaciones de liberación modificada con lo que se pretende modificar el

perfil farmacocinético, la mayor biodisponibilidad se obtiene con la administración subcutánea (SC) y la menor por la vía oral. La baja solubilidad de la ivermectina en agua y la precipitación de ésta en los tejidos cuando es aplicada por vía SC permite que permanezca de forma prolongada en el torrente sanguíneo<sup>21</sup>.

Los procesos de absorción manifiestan diferencias según las vías de administración y las especies tratadas, por ejemplo, en bovinos la ivermectina se detecta en plasma después de 1 h de haberla aplicado y hasta 30 días después de la administración de una dosis de 200 µg/kg por vía SC. Algunos preparados oleosos aplicados por vía SC llegan a brindar concentraciones terapéuticas por 80-90 días.

La ivermectina se metaboliza poco, la mayor parte de la dosis se excreta sin cambios, parece ser que el metabolismo de la ivermectina es a través de procesos de hidroxilación en el rumen, estómago o intestino, independientemente de la vía de administración<sup>22</sup>.

La ivermectina se elimina principalmente en las heces, en todas las especies independientemente de la vía de administración, la cantidad excretada por heces representa más del 90% de la dosis administrada, mientras que la eliminada por la orina representa menos del 2%, este fármaco sufre ciclo entero hepático, es decir, cuando se administra pasa a sangre y de ahí regresa a tracto digestivo sin metabolizarse y es excretado en heces (Figura 1).

## ANTECEDENTES

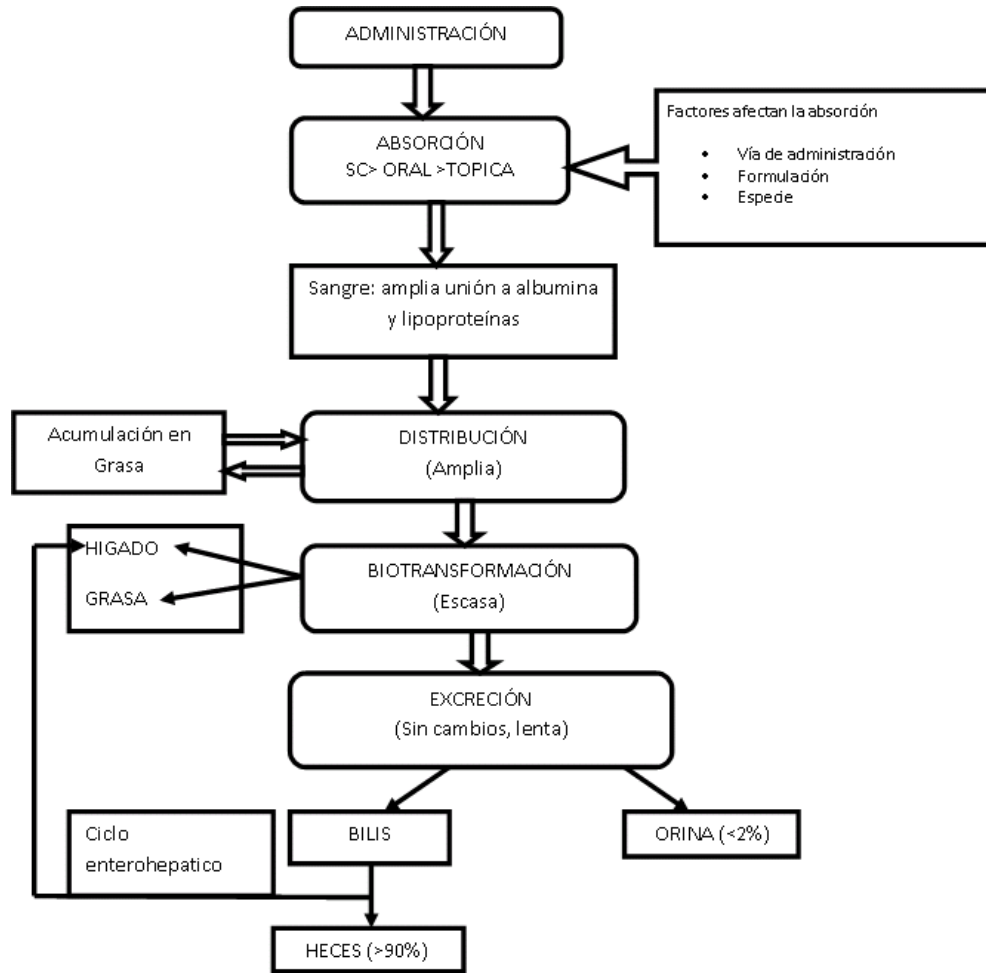


Figura 1. Farmacocinética de la ivermectina <sup>23</sup>.

### 3.2.2. Riesgos de la ivermectina, excretada por el ganado previamente tratado, en el ambiente

Debido a que los medicamentos de uso veterinario son utilizados en grandes cantidades para el tratamiento del ganado, desde hace varios años ha comenzado a tomar importancia lo que sucede con los fármacos o sus metabolitos cuando son excretados al ambiente, se han realizado varios estudios de los efectos de los fármacos sobre el ambiente en los cuales se ha visto que muchos de estos tienen un efecto negativo importante sobre la fauna del suelo y agua. Un grupo ampliamente estudiado es el de los antiparasitarios, ya que estos han demostrado que al ser eliminados al ambiente tiene efecto

sobre especies no blanco (escarabajos, lombrices, abejas, moscas y peces) lo que provoca, un desequilibrio en el ambiente.

Las rutas por lo que los fármacos pueden llegar al ambiente son varias; pero una ruta que ha tomado importancia es cuando el fármaco o sus metabolitos son eliminados por las heces u orina de animales previamente tratados, al ser eliminado el fármaco por esta ruta llega al suelo o puede ser transportado a cuerpos de agua donde tiene un efecto negativo sobre la fauna de estos ambientes.

Uno de los casos más estudiados ha sido la ivermectina, la cual ha sido ampliamente utilizada para el tratamiento de parásitos en el ganado y en mascotas en varios tipos de formulaciones (inyectables, orales y tópicas). Desde su introducción al mercado en 1981 por Merck Sharp and Dohme se han aplicado más de 5 millones de dosis de ivermectina (por diferentes vías: subcutánea, intramuscular, intravenosa, oral y tópica) al ganado en el mundo, lo que lo hace el medicamento antiparasitario más utilizado<sup>24</sup>. Se han realizado diversos estudios sobre lo que sucede con las cantidades de ivermectina excretadas de forma inalterada por el ganado tratado, principalmente por las heces las cuales en su gran mayoría entran en contacto con el suelo, además que el estiércol proporciona un hábitat de alimentación y reproducción para un gran número de especies de invertebrados, principalmente insectos,<sup>25</sup> que pueden verse afectadas.

Varios estudios han demostrado que la ivermectina que es eliminada en las heces produce efectos negativos sobre la fauna propia del suelo como escarabajos, lombrices, abejas, moscas, microorganismos etc. Por ejemplo se ha estudiado desde mediados de la década de 1970 el impacto en la supervivencia de los escarabajos encargados de la degradación del estiércol<sup>26</sup>.

En un estudio realizado en 2005, se evaluó la supervivencia de larvas de escarabajo de la especie *Aphodius constans*, después de la exposición a cuatro antiparasitarios veterinarios: ivermectina, moxidectina, diciclanil y



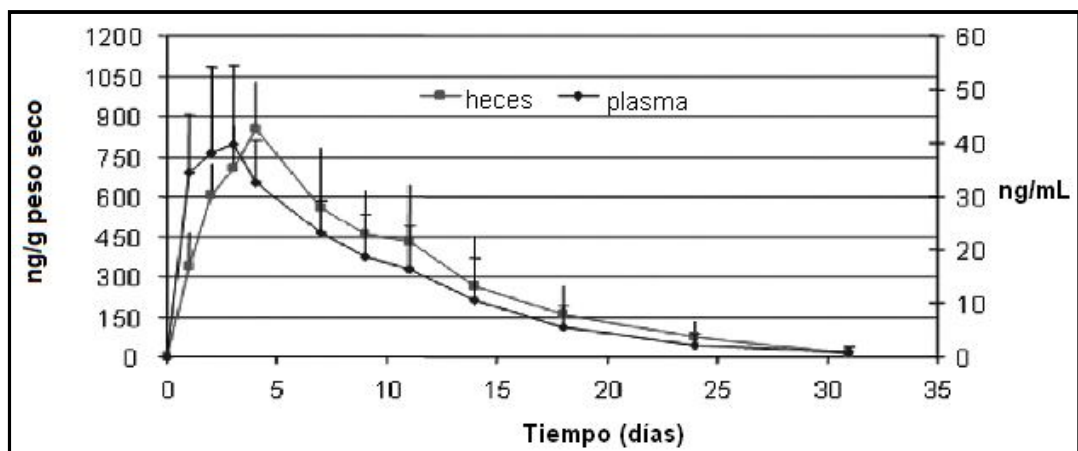
praziquantel. El estudio se realizó con estiércol obtenido de ganado que no había recibido tratamiento con antiparasitarios, las muestras obtenidas fueron adicionadas con los antiparasitarios a diferentes concentraciones con la finalidad de obtener la concentración letal 50 de cada uno de los fármacos. Los resultados obtenidos demostraron que el fármaco más tóxico fue la ivermectina con una concentración letal 50 (CL50) de 0.88-0.98 mg de principio activo por kilogramo de estiércol [mg p.a/ kg estiércol (peso seco)], seguido por el diciclanil con una CL50= 1.5-6.0 mg p.a / kg estiércol y para la moxidectina la CL50 =4.0-5.4 mg p.a/ kg estiércol, mientras que el praziquantel mostró muy baja toxicidad CL50> 1,000 mg p.a/ kg estiércol <sup>27</sup>.

En otro estudio se determinó el efecto de la ivermectina excretada en heces de ganado tratado previamente con este fármaco, el estudio se realizó en dos grupos de terneros, a un grupo se le administró ivermectina (IVOMEC, Merial) por vía subcutánea en una dosis de 0.2 mg/ kg de peso mientras que el otro grupo sirvió como control (sin tratar). Las heces depositadas en los días 1 ,3 ,7 ,14 y 21 post-tratamiento (dpt) se recolectaron los 1, 3, 7, 14, 21, 30 y 60 días post deposición (dpd), y se cuantificó la concentración de ivermectina, el porcentaje de materia orgánica y la recolección de los organismos colonizadores. Las muestras de 1 y 3 dpt tuvieron la mayor concentración de ivermectina y el más alto porcentaje de materia orgánica comparado con el grupo control. Las heces del grupo tratado mostraron menor abundancia y diversidad de artrópodos (principalmente escarabajos, arañas, colémbolos, moscas, hormigas y abejas). La mayor reducción en el número y diversidad de la fauna del estiércol fue en las muestras 1, 3 y 7 dpt, las cuales tuvieron la mayor concentración de ivermectina y cantidad de materia orgánica<sup>28</sup>.

Mientras que en un estudio realizado durante 2005 y 2006 en el Centro de Investigación del Medio Ambiente Castillo de Johnstown, Wexford, Irlanda, se investigó el efecto de la concentración de ivermectina en varios estados de desarrollo de dos especies de escarabajos del estiércol (*Aphodius ater* y *Aphodius rutipes*). Se recolectaron muestras de estiércol del ganado tratado con ivermectina vía subcutánea (Qualimec<sup>TM</sup>,Eco Animal Health Limited,

Surrey,UK) en una dosis de 0.2 mg/kg de peso. Los bioensayos se realizaron dando como alimento el estiércol que contenía diferentes concentraciones de ivermectina; se midió la supervivencia de los adultos y la oviposición, así como también el desarrollo y la supervivencia de las larvas durante la duración de bioensayo. La presencia de ivermectina en las heces produjo una reducción significativa de la tasa de desarrollo de las larvas y también un efecto negativo en la supervivencia de las larvas, causando importantes reducciones en el número de escarabajos de las siguientes generaciones. Sin embargo, los estudios mostraron que la concentración de ivermectina no tuvo efectos significativos en la supervivencia de los adultos; pero si hubo un reducción del número huevos por cada hembra (*Aphodius rutipes*)<sup>29</sup>.

También, las concentraciones de ivermectina excretada en heces por el ganado han sido cuantificadas<sup>30</sup>, en la gráfica 4 se muestran las concentraciones en plasma y en heces después de la administración de una sola dosis de ivermectina.



Gráfica 4. Concentración de ivermectina en plasma y estiércol con respecto al tiempo de una sola administración subcutánea de ivermectina (200µg/kg) en ganado (n=5).<sup>30</sup>

En la gráfica 4 se observa que la máxima concentración de ivermectina en plasma es de  $46.49 \pm 12.70$  ng/mL a los  $2.20 \pm 0.84$  días después de la administración y en heces de  $871.90 \pm 152.50$  ng/g, a los  $5.60 \pm 3.44$  días después de la administración respectivamente. La permanencia de ivermectina

## ANTECEDENTES

en plasma después de la administración subcutánea es larga ( $t_{1/2} = 4.18 \pm 1.52$  días). Estos datos ofrecen una evaluación de los posibles riesgos de la ivermectina excretada a diferentes tiempos sobre organismos acuáticos y terrestres, en la tabla 4 se muestra la estimación del efecto que produce la ivermectina excretada en heces sobre la fauna degradadora del estiércol comparado con los datos de la Gráfica 4.

Tabla 4. Evaluación del riesgo de la ivermectina excretada en el estiércol <sup>30</sup> .				
Fauna del estiércol	Efecto de la concentración	Efecto Claro (días) <sup>a</sup>	Impacto Alto (días) <sup>b</sup>	Impacto Potencial (días) <sup>c</sup>
<b><i>Haematobia irritans</i></b> (mosca)	CL50 < 4.4 mg/kg <sup>31</sup>			
<b><i>Musca autumnalis</i></b> (mosca)	CL50 < 4.4 mg/kg <sup>31</sup>			
<b><i>Neomyia cornicina</i></b> (mosca)	CL50 = 0.125 mg/kg <sup>32</sup>	2-18	2-30	>30
<b><i>Musca domestica</i></b> (mosca)	NOEC* = 0.10 mg/kg <sup>33</sup>		2.-18	>30
<b><i>Scathophaga stercoraria</i></b> (mosca)	CL50 = 0.036 mg/kg <sup>34</sup>	2-30	>30	>30
	CL50 = 0.001 mg/kg <sup>34</sup>	2-30	>30	
<b><i>Aphodius constants</i></b> (escarabajo)	CL50 = 0.04 mg/kg <sup>35</sup>	2-28	>30	>30
<b><i>Onthophagus taunts</i></b> (escarabajo)	CL50 = 0.1 mg/kg <sup>36</sup>	2-18	2-30	>30

a. Intervalo (días) cuando la concentración de ivermectina en estiércol es mayor que la CL50.

b. Intervalo (días) cuando la concentración de ivermectina en estiércol es mayor que la CL<sub>50</sub>/50 o mayor que NOEC.

c. Intervalo (días) cuando la concentración de ivermectina en estiércol es mayor que CL<sub>50</sub>/ 100 o mayor que el NOEC/10

\* NOEC: Concentración más alta de fármaco que no causa efecto (mortalidad, alteraciones de la reproducción, cambios comportamiento) en la población estudiada para un tiempo determinado.

El efecto sobre los escarabajos y moscas es importante en los primeros treinta días, donde se observa que las concentraciones en heces pueden producir la muerte de estas especies. Para los escarabajos de la especie *Aphodius constants* en los días 2 al 28 las concentraciones en el estiércol son mayores que el CL50 =0.04 mg/kg (mg de ivermectina por kg de estiércol) por lo que durante este intervalo los escarabajos expuestos al estiércol de animales tratados con ivermectina produciría la muerte de éstos. Lo mismo sucede con la especie *Onthophagus taunts*, la cual se ve afectada por las concentraciones en el estiércol en los días 2 al 18 que es donde la concentración es mayor a la CL50. Las dos especies pueden verse afectadas aún después de los 30 días, ya que se debe considerar otros factores que afectan la degradación del fármaco (temperatura, pH y actividad de los microorganismos). Las moscas también se ven afectadas por las concentraciones en el estiércol de animales tratados con ivermectina en los días 2 al 30 que es donde se alcanzan concentraciones mayores al CL50, aunque hay dos especies (*Haematobia irritans* y *Musca autumnalis*) que no se ven afectadas ya que las concentraciones en el estiércol son menores a sus CL50, hay que recordar que la tabla 4 solo es una estimación, por lo que los efectos producidos por la ivermectina podrían verse disminuidos o aumentados por diferentes factores.

La fauna del suelo ayuda en los procesos de descomposición de materia orgánica, uno de estos procesos es la descomposición del estiércol en la cual participan los escarabajos construyendo túneles en el suelo donde cargan porciones de materia fecal formando estructuras para depositar un huevo, el cual se alimentará del estiércol al nacer<sup>37</sup>; promueven la descomposición junto con los microorganismos, las lombrices de la tierra y demás fauna del suelo. La descomposición del estiércol es importante para las tierras de pastoreo y es una de las principales contribuciones al ciclo de los nutrientes, además se debe considerar que la fauna del suelo constituye parte de la dieta de varias especies de vertebrados silvestres, los cuales incluyen los murciélagos y aves de interés particular para la conservación del equilibrio ecológico<sup>38</sup>. Los escarabajos del estiércol se han visto afectados por una serie de cambios en el uso del suelo debido a la ganadería, al desarrollo urbano asociado con la

invasión y destrucción de su hábitat<sup>39</sup>, a la conversión de pastizales en tierras de cultivo, a los cambios en los métodos de la agricultura tradicional (por ejemplo el uso de fertilizantes)<sup>40</sup>, y uso de medicamentos veterinarios (ejemplo: ivermectina)<sup>41,42</sup>.

La toxicidad de la ivermectina sobre las poblaciones de insectos que degradan el estiércol, se asocia con una disminución en la descomposición de las heces que contienen ivermectina, se ha demostrado que permanecen intactas después de 340 días en contraste las que no contienen ivermectina el tiempo en ser degradadas es aproximadamente 80 días<sup>43</sup>. El aumento en el tiempo de la degradación del estiércol trae consigo consecuencias directas contra el ambiente, produce alteraciones en la absorción de nutrientes al suelo lo que disminuye la calidad de los pastos de los que se alimenta el ganado, por lo que se tiene que invertir mayor cantidad de dinero para su alimentación; además que de grandes extensiones de tierra se vuelven infértiles, por lo cual se abandonan y es necesario buscar nuevas tierras para la alimentación del ganado.

Los escarabajos son importantes para la dispersión e incorporación de las heces del ganado al suelo, manteniendo la fertilidad de los pastizales a través de la incorporación de los nutrientes al suelo, por ejemplo el 80% del nitrógeno de las heces que permanecen en la superficie del pasto se pierde por la volatilización; pero cuando los escarabajos del estiércol entierran las heces rápidamente la pérdida se reduce a 15.5%, el rápido reciclaje de los nutrientes volátiles presentes en las heces por medio del enterramiento a través de los escarabajos ha demostrado que aumenta el rendimiento de los pastos, mejorando la estructura, aireación y capacidad de retención de agua del suelo. También la rápida incorporación de materia orgánica al suelo da como resultado una reducción de plagas que se reproducen en el estiércol (ejemplo: mosca de los cuernos y algunos parásitos gastrointestinales) que afectan al ganado, otro servicio al ecosistema de los escarabajos del estiércol es la dispersión de semillas<sup>44,44b</sup>.

Losey y Vaughan estimaron en 2006 el valor de los escarabajos estercoleros en la industria ganadera de los Estados Unidos en 380 millones de dólares por año, esta suma representa: los costos estimados al no tener que utilizar fertilizantes, así como la pérdida de tierras de pastoreo debidas a la acumulación de heces del ganado y al aumento del contagio del ganado por parásitos intestinales<sup>3</sup>.

Se debe considerar que los escarabajos no son los únicos organismos que contribuyen significativamente a funciones ecológicas que son vitales tales como polinización, control de plagas, la descomposición de materia orgánica, y el mantenimiento de las especies de vida silvestre, también participan las lombrices de tierra, las abejas y microorganismos, los cuales de alguna manera podrían verse afectados por los fármacos que son excretados por el ganado tratados, por ejemplo la ivermectina.

Las estimaciones del valor de los servicios que proporcionan los insectos puede ser aproximadamente de 60 mil millones de dólares al año sólo en los Estados Unidos<sup>3</sup>, por lo que se debe considerar la inversión en investigación y programas para proteger a los insectos de las amenazas por el uso intensivo de productos químicos y la destrucción de su hábitat.

❖ CICLO DE VIDA DEL ESCARABAJO (*Scarabaeidae*; *Scarabaeinae*).

Es importante conocer el ciclo de vida del escarabajo, para conocer en cuales etapas los escarabajos podrían verse afectados por la presencia de ivermectina en la heces de las cuales se alimentan. Los escarabajos, al igual que todos los insectos nacen de huevos y su desarrollo se cumple gracias a una serie de eventos de diferenciación las cuales incluyen formas larvarias y pupales; a este tipo de desarrollo se le denomina metamorfosis. El ciclo presenta cuatro etapas: huevo, larva, pupa y adulto (figura 2); las hembras depositan los huevos en sitios que sirven de fuente de comida, donde los abandonan de los huevos emergen las larvas, las cuales consumen grandes

cantidades de alimento. Después las larvas mudan a pupas, que son estados inactivos, sin alimentación, con una reorganización marcada de órganos y sistemas orientados a la conformación de lo que será el individuo adulto. El adulto, que emerge de la pupa mediante una muda adicional, no crece ni se transforma más, a excepción del endurecimiento y oscurecimiento de la coloración de su cuerpo. Los adultos adquieren pronto su madurez sexual y en este estado se cumplen el apareamiento y la reproducción.

El ciclo completo, de huevo a adulto, puede variar desde unos pocos meses hasta dos o tres años. Normalmente el ciclo de vida de una especie está en concordancia temporal con el ciclo climático anual de la región en que se presenta. En la tabla 5 se muestran los duraciones de cada una de las etapas para la especie Scarabaeidae; Scarabaeinae.

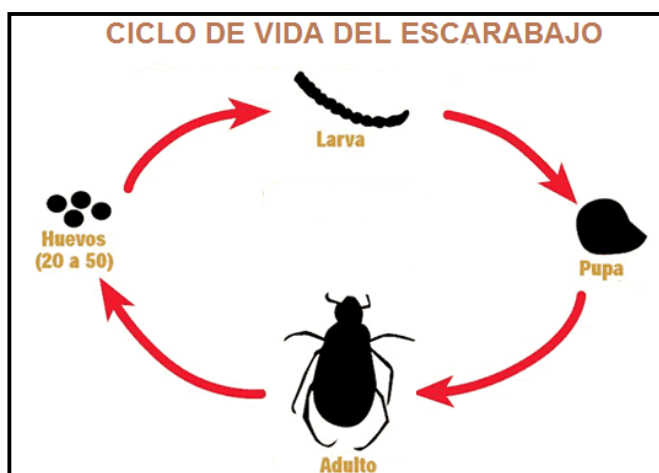


Figura 2. Ciclo de vida del escarabajo.

Tabla 5 <sup>45</sup>	
Estado	Rango (días)
Huevo	5-7
Larva	30-51
Pupa	8-13

### 3.3. Química supramolecular

La química supramolecular esta enfoca en el estudio y empleo de sistemas moleculares unidos a través de interacciones no covalentes, tales como

puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, interacciones ion-metal y interacciones  $\pi$ - $\pi$ . Una área importante de química supramolecular es el estudio de los complejos formados por dos o más moléculas que interactúan entre sí produciendo una estructura única.

La importancia de la química supramolecular es utilizar las moléculas ya existentes o sintetizar moléculas nuevas para preparar agregados o conjuntos moleculares con las características deseadas, por ejemplo la detección de especies de importancia biológica o el control de liberación de fármacos dentro del paciente. Un ejemplo del impacto de la investigación de la química supramolecular es el diseño y síntesis de moléculas que responden a un analito en particular<sup>46</sup>.

### **3.3.1. Impresión molecular**

El reconocimiento molecular actualmente es un área muy estudiada en la química actual, se han desarrollado un gran número de sistemas capaces de mostrar reconocimiento molecular, muchos han sido inspirados en los sistemas vivos y entre éstos se han estudiado, sobre todo en las últimas décadas, materiales capaces de reconocer a una molécula, estos materiales se han obtenido al utilizar una técnica conocida como "impresión molecular". El concepto se basa en la preparación de sitios de reconocimiento selectivos a un sustrato en una matriz utilizando una molécula molde (también llamada horma o templado). La molécula molde se coloca en una solución, en donde se encuentran los elementos que formarán la matriz, la molécula molde interactúa con estos elementos formando un pre-arreglo el cual conducirá a la formación de una matriz con sitios de reconocimiento selectivos a la molécula molde (Figura 3), con esta técnica es posible imitar de manera artificial el reconocimiento molecular en los sistemas vivos, obteniéndose de esta forma materiales que se caracterizan por tener una alta estabilidad física y química.



En teoría es posible obtener materiales para diferentes tipos de moléculas tales como fármacos, aminoácidos, hormonas o algunas más grandes tales como péptidos o proteínas, por lo que es una técnica muy utilizada para obtener materiales con características de reconocimiento molecular.

El papel que desempeñan las interacciones intermoleculares hace que la impresión molecular se englobe dentro de la química supramolecular, que abarca toda la química del diseño, síntesis y estudio de entidades formadas por asociaciones de dos o más especies, concretamente en la rama de la química biomimética, la cual se ocupa de la síntesis y caracterización de materiales en los que participan fundamentalmente interacciones del tipo huésped receptor (llave-cerradura)<sup>47</sup>.

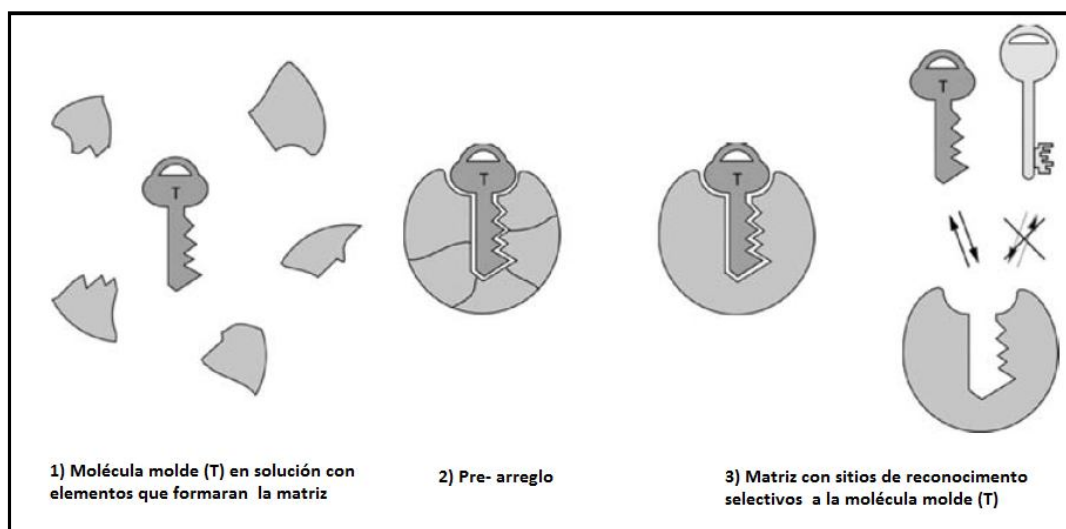


Figura 3. Técnica de impresión molecular.

### 3.3.1.2 Reconocimiento molecular

El reconocimiento molecular forma parte de casi todos los procesos biológicos, y se puede definir como la interacción específica entre dos o más moléculas a través de la unión no covalente, tales como puentes de hidrógeno, la coordinación del metal, las interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals, interacciones  $\sigma$ - $\sigma$ , electrostáticas y/o efectos electromagnéticos. El

anfitrión y el huésped involucrados en el reconocimiento molecular muestran complementariedad molecular.

De aquí se puede concluir que es muy importante considerar dos factores para que se de el fenómeno de reconocimiento molecular; interacciones específicas y complementariedad geométrica. El reconocimiento molecular tiene un papel importante en los sistemas biológicos, por ejemplo en las enzimas, anticuerpos o receptores hormonales capaces de identificar selectivamente a un sustrato, antígeno u hormona respectivamente.

El concepto de las interacciones moleculares es muy antiguo; pero a partir de la segunda mitad de siglo XIX las ideas modernas sobre las interacciones comenzaron a surgir, a través de la labor de Johannes Diderik Van der Waals en sus estudios de las interacciones entre los átomos en estado gaseoso y la teoría de Alfred Werner en química de coordinación. En 1894 Emil Fischer presentó su analogía “llave-cerradura” que representa la forma en que interactúa un sustrato con su enzima, según esta propuesta, una enzima; que es más grande en comparación con su sustrato, tiene grietas y huecos en su superficie complementarias a la forma del sustrato, de modo que el sustrato encaja sobre estos sitios activos del enzima como si se tratara de una llave en sus cerradura. En los sistemas biológicos se han formado una gran cantidad de interacciones no covalentes como puentes de hidrógeno, iónicas e hidrofóbicas, que en comparación con los enlaces covalentes son menos fuertes; pero la acción simultánea de interacciones no covalentes puede conducir a la formación de complejos con alta estabilidad<sup>48</sup>.

### **3.3.2. Polímeros de impresión molecular**

Los polímeros de impresión molecular (MIP) son polímeros sintéticos que poseen cavidades específicas para una molécula, los sitios de reconocimiento específicos son complementarios en forma, tamaño y grupos funcionales a esta molécula, la cual actúa como molde, con la participación de interacciones basadas en el reconocimiento molecular. Su nombre se debe a que es un

análogo del proceso de “impresión” que trata de colocar una figura específica en un material.

Los sitios de reconocimiento son similares a los sitios de unión de sistemas biológicos como anticuerpos y enzimas. Su estabilidad, facilidad y bajo costo de preparación han sido atractivos para su uso en numerosas aplicaciones.

### **3.3.2.1. Tipos de polímeros de impresión molecular**

Existen dos rutas de síntesis: no covalente y covalente, que difieren en el mecanismo de interacción entre el monómero y la molécula molde durante la pre-polimerización.

#### **❖ Tipo no covalente**

La molécula molde interacciona con los monómeros funcionales en una primera etapa denominada pre organización o pre-arreglo, en la que se da un ordenamiento de los monómeros alrededor de la misma. Los grupos funcionales de la molécula molde interaccionan a través de interacciones de tipo Van der Waals, dipolares, electrostáticas y de puentes de hidrógeno (figura 4), con los monómeros formando una estructura pre organizada. Esta estructura es la parte más importante en los MIPs debido a que más adelante será la huella de la molécula.

La impresión no covalente es simple y versátil, con la generación de una amplia variedad de uniones (iónicas, dipolares, puentes de hidrogeno) durante la síntesis, uniones análogas a las que ocurren en los procesos biológicos. Además de ser más flexible en la elección de reactivos y por lo tanto más fácil de implementar; las desventajas de la impresión no covalente son una distribución no uniforme de sitios de unión debido al número alto de asociaciones que pueden formarse entre la molécula molde y los precursores durante la etapa de preorganización.

En los procesos de impresión molecular no covalente, el disolvente juega un papel muy importante ya que determina la fuerza de unión de las interacciones, además de influir en la morfología final del polímero en función de su capacidad porogénica. De forma general, cuanto más polar es un disolvente, menor es la capacidad de reconocimiento en el material resultante<sup>47</sup>, esto debido a que los disolventes con alta polaridad interfieren con las interacciones iónicas y de Van de Waals entre el monómero y el templado, por lo que se utilizan principalmente disolventes con baja polaridad<sup>48</sup>.

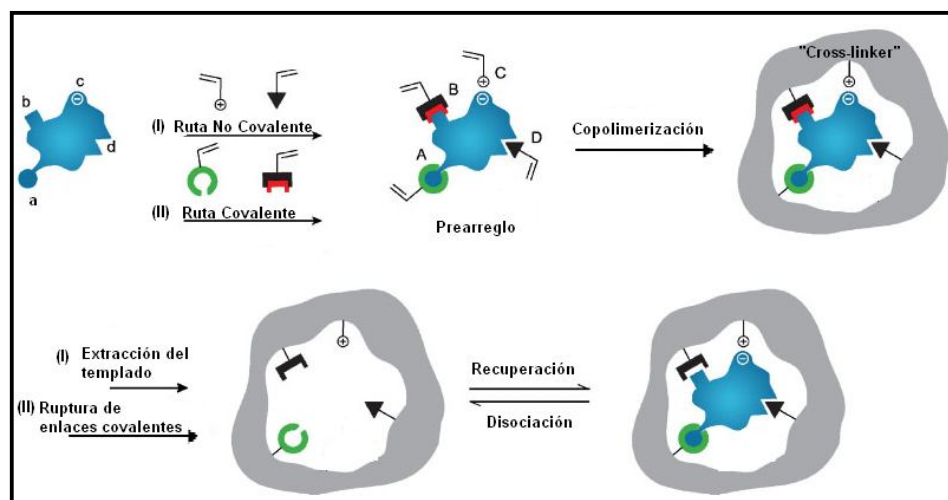
Los disolventes que tienen tendencia a aumentar la fuerza de las interacciones no covalentes son aquellos que poseen una constante dieléctrica bajas, ya que en un disolvente con constante dieléctrica baja, la fuerza de atracción entre dos moléculas con cargas opuestas será mayor que en uno con constante dieléctrica alta<sup>48</sup>; según la ley de Coulomb (ecuación 1) donde  $F$  es la fuerza entre dos cargas eléctricas,  $q_1$  y  $q_2$  que están separadas por una distancia  $r$ ,  $D$  es la constante dieléctrica del medio entre ellas y  $k$  es una constante de proporcionalidad ( $8.99 \times 10^9 \text{ J m C}^{-2}$ ). Así, a medida que la constante dieléctrica de un elemento aumenta, la fuerza entre sus cargas disminuye, por lo tanto la constante dieléctrica de un solvente es una medida de su capacidad de mantener separadas las cargas opuestas. La constante dieléctrica del agua figura entre las más altas, mientras que las constantes dieléctricas de las sustancias no polares, como los hidrocarburos, son relativamente pequeñas. La fuerza entre dos iones separados por una distancia dada en los líquidos no polares, como el hexano o el benceno, es 30 o 40 veces mayor que en el agua<sup>49</sup>. El disolvente también controla el área superficial y el tamaño medio de poro que se genera en los polímeros<sup>47</sup>.

$$F = \frac{kq_1 q_2}{Dr^2}$$

Ecuación 1.

❖ Tipo covalente

En la síntesis covalente, el monómero es el primero en unirse a la molécula molde a través de un enlace covalente que en las condiciones adecuadas puede ser reversible (figura 4). Con el fin de obtener sitios de unión específicos y homogéneos, es importante mantener complejos monómero-molde estables durante el proceso de impresión, en este punto la impresión covalente presenta ventaja sobre la no covalente, la principal desventaja de la impresión covalente es que los polímeros presentan una cinética de unión lenta que no es adecuada para las separaciones cromatográficas en columna <sup>50</sup>, además de que existe un limitado número de monómeros capaces de formar enlaces covalentes reversibles con la molécula molde. La síntesis de estos polímeros es más compleja que la de los polímeros no covalentes, ya que se requiere de la síntesis previa del compuesto “molécula molde-monómero”, así como un tratamiento químico agresivo para romper los enlaces covalentes formados y eliminar la molécula molde, dejando libre las cavidades responsables del reconocimiento en la matriz polimérica.



**Figura 4. Representación esquemática del proceso de impresión molecular, en donde pueden estar involucrada una o más de la siguientes interacciones en el pre-arreglo: (A, B) enlace covalente, (C) interacciones electrostáticas y (D) puentes de hidrogeno y tipo Van der Waals<sup>51</sup>.**

---

---

### 3.3.2.2. Síntesis de polímero de impresión molecular

Los polímeros de impresión molecular son preparados en presencia de una especie molecular que tiene la función de molde para la formación de una plantilla complementaria con sitios de unión específicos. El proceso de impresión molecular comienza con la selección del tipo de impresión covalente o no covalente, hay muchos factores que influyen en seleccionar el tipo de impresión molecular, el más importante es el tipo de molécula que se va utilizar como molde, así como la disponibilidad de sus grupo funcionales, la estructura, el tamaño, su solubilidad y la aplicación final del material impreso dictan la elección del método de impresión. En la mayoría de los casos la estructura de la molécula utilizada como horma es el punto clave para la elección de los materiales y de cómo lograr el reconocimiento, los criterios para seleccionar la molécula que será utilizada como horma son: ausencia de grupos polimerizables, lo ideal sería que fuera químicamente inerte a las condiciones de polimerización, estable a las condiciones de temperatura o a la exposición a la radiación UV, disponibilidad y por supuesto su capacidad de interactuar fuertemente con el monómero. En el caso de la impresión no covalente, las interacciones implicadas son débiles, por la tanto el candidato a plantilla debe poseer múltiples sitios funcionales capaces de aumentar la fuerza monómero-plantilla <sup>52</sup>.

Es de gran importancia realizar una cuidadosa selección de los componentes para sintetizar los polímeros de impresión molecular, en su mayoría estos componentes son monómeros capaces de formar redes de polímero o geles suficientemente estables para mantener memoria de la molécula utilizada como molde. Normalmente son utilizados en exceso en relación al número de moles del molde a fin de favorecer la formación de matriz polimérica, los materiales que han sido utilizados en la impresión molecular son: orgánico; poliuretanos y poliésteres, inorgánicos; polisiloxanos, polisilanos, policarbosilanos y organometálicos; poligermanatos o poliestannatos, así como combinaciones.

En general el monómero funcional se selecciona en función de la naturaleza de la horma; cuando existan grupos funcionales básicos, será adecuado para

generar interacciones iónicas o puentes de hidrógeno utilizando monómeros con grupos funcionales ácidos (ácido acrílico, ácido metacrílico, ácido *p*-vinilbenzoico, etc.) como ejemplo los grupos éter de la ivermectina son susceptibles de formar puentes de hidrógeno con el grupo funcional del ácido metacrílico ; pero si el templado tiene grupos ácidos la elección más apropiada sería la de bases débiles como la vinilpiridina<sup>47</sup>.

Para conseguir un reconocimiento molecular adecuado se utilizan agentes entrecruzadores o en inglés “cross- linker”, los cuales tienen tres principales funciones: controlar la morfología de la matriz del polímero, estabilizar el sitio de reconocimiento impreso, y por último dar estabilidad mecánica a la matriz polimérica<sup>53</sup>. Los más utilizados son el dimetacrilato de etilenglicol, trimetacrilato de trimetilpropano, el divinilbenceno y triacrilato/tetracrilato de pentaeritrol.

Iniciadores: los iniciadores de la polimerización más empleados son los compuestos de tipo azo, como el 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) o el azobisdimetilvaleronitrilo, con los cuales se consigue una velocidad de descomposición apropiada con un calentamiento de la mezcla de reacción moderado (50-60°C) cuando la molécula molde es termolábil es posible generar radicales libres a baja temperatura, por debajo de 4°C, mediante radiación UV.

La elección del disolvente en el que será llevada la síntesis es crítica ya que la naturaleza del disolvente determina la fuerza de las interacciones e influye en la morfología final del material (tamaño y distribución de los poros, área superficial) particularmente cuando la síntesis se lleva a cabo por vía no covalente. Debido a la importante participación en la creación de poros en los polímeros se suele referir al disolvente como “porógeno”. Su doble función como disolvente y como formador de poros debe ser considerada al momento de la elección del disolvente a utilizar, por ejemplo los disolventes con polaridad moderada (acetonitrilo y cloroformo), o con baja constante dieléctrica (tolueno y diclorometano) son los más utilizados en la síntesis de polímeros orgánicos por vía no covalente ya que favorecen las interacciones entre la horma y los

---

---

monómeros funcionales. Si el disolvente es polar, compite con los monómeros funcionales por los puntos de interacción con la horma<sup>47</sup>.

### **3.3.3. Polimerización por radicales libres**

La polimerización por radicales libres es el método más importante para la síntesis de polímeros, es utilizado en la industria para la producción a gran escala de varios tipos de plásticos de importancia comercial<sup>53</sup>, varios tipos de monómeros se pueden polimerizar por este método obteniendo buenos rendimientos, (además de ser un método eficaz). La polimerización por radicales libres puede llevarse bajo condiciones de reacción suaves (temperatura ambiente y presión atmosférica), por lo que este método suele ser la elección para la preparación de polímeros de impresión molecular. El mecanismo de polimerización por radicales libres tiene tres etapas clave: (I) inicio, (II) propagación, (III) terminación.

El proceso de polimerización puede ser de tipo térmico o fotoquímico (luz UV), también se puede realizar por el método sol-gel, la elección depende fundamentalmente del tipo de molécula que se esté usando como molde.

### **3.4. Extracción de la molécula molde**

Esta etapa tiene como finalidad la eliminación de la molécula molde de la matriz polimérica, de manera que la cavidad quede libre con lo que obtenemos una cavidad estable, complementaria en forma y distribución de grupos funcionales a dicho compuesto. La extracción de la molécula molde puede llevarse mediante procesos de lavado, extracción sólido/líquido, tratamiento térmico, digestión en microondas e incluso utilizando agentes químicos que destruyan la molécula molde.

La preparación en bloque es el formato más utilizado gracias a su simplicidad, consiste en colocar la mezcla de reactivos en las condiciones adecuadas, con lo cual se obtiene un polímero en bloque (es decir que el polímero toma la forma del recipiente en el que se lleva a cabo la reacción de polimerización)



que puede ser molido y tamizado antes de su uso. Las principales desventajas de este proceso son la pérdida de material durante el tamizado y la extracción de la molécula molde, la amplia distribución del tamaño de las partículas y la forma irregular de las mismas.

La preparación en láminas delgadas se hace por inmersión del elemento seleccionado como soporte (placa de vidrio, placas de oro, electrodos, etc) en la mezcla de reactivos (cobertura de inmersión) o mediante el empleo de un spin-coater (cobertura por rotación, o spin-coating). Las ventajas del método son la obtención de cavidades con forma y tamaño bien definidos que no sufren alteraciones debido a que no son necesarios procesos de acondicionamiento posteriores (molienda, tamizado) y por la fácil accesibilidad de la molécula en estudio a prácticamente la totalidad de los sitios activos del material.

#### **3.4.1. Aplicaciones de los polímeros de impresión molecular**

Se han desarrollado polímeros molecularmente impresos para una amplia gama de analitos, fármacos, herbicidas y otras sustancias de importancia e interés biológico y medioambiental.

Los polímeros de impresión molecular se han utilizado como sensores de naturaleza óptica, por ejemplo un sol-gel impreso para el antibiótico nafcilina con transducción de fosforescencia<sup>54</sup>, un sensor compuesto por un conjunto de siete polímeros impresos para reconocer siete diferentes aminas aromáticas<sup>55</sup>. Otro ejemplo es el desarrollo de una nueva clase de inmunoensayo donde se sintetizan polímeros impresos para teofilina y diazepam, los cuales actúan imitando a los anticuerpos que generalmente son utilizados para la determinación en suero humano de estos fármacos<sup>6</sup>. Entre la gran variedad de sistemas estudiados se pueden encontrar de muchos tipos, por ejemplo; se han desarrollado sensores electroquímicos para análisis de colesterol<sup>56</sup>.

Las técnicas cromatográficas de separación son las que se han visto más beneficiadas con el uso de MIPs, la combinación de la impresión molecular con la cromatografía líquida de alta resolución ha resultado tan eficaz, que se han descrito trabajos que permiten la separación de enantiómeros en mezclas racémicas, utilizando como fase estacionaria polímero impreso con uno de los enantiómeros puros <sup>4,5</sup>.

La característica del polímero molecularmente impreso para unirse al analito (fármaco) de interés con elevada afinidad ha permitido su aplicación como sistemas de liberación modificada, estos sistemas permiten modificar el sitio o la velocidad de liberación del principio activo, reduciendo los efectos secundarios y aumentando la eficacia del fármaco, estos sistemas permiten una liberación constante del fármaco. Se han sintetizado los MIPs para algunos fármacos como por ejemplo: bromhexina<sup>57</sup>, teofilina<sup>58</sup> y propanolol<sup>59</sup>.

También, se han utilizado como materiales adsorbentes que son administrados por vía oral con el fin de atrapar moléculas como los ácidos biliares, para este ejemplo se sintetizó el MIP s utilizando a la alilamina como monómero funcional y como agente entrecruzador a la epiclorhidrina, la molécula molde fue el colato de sodio (sal sódica del ácido cólico), se sintetizaron MIPs con diferentes concentraciones de la molécula molde (tabla 6).

Tabla. 6 <sup>9</sup>				
Polímero	Alilamina (meq)	Epiclorhidrina (mmol)	Colato (mmol)	mmol de colato / g polímero
<b>NIP</b>	53.42	37.5	-	1.30
<b>MIP-1</b>	53.42	37.5	2.31	1.07
<b>MIP-2</b>	53.42	37.5	11.39	1.97

La evaluación *in vivo* realizada en hámsters demostró que el grupo al cual se incluyó el polímero impreso en su dieta eliminó en heces más ácidos biliares que el grupo en donde se utilizó el polímero no impreso<sup>10</sup>. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 5.

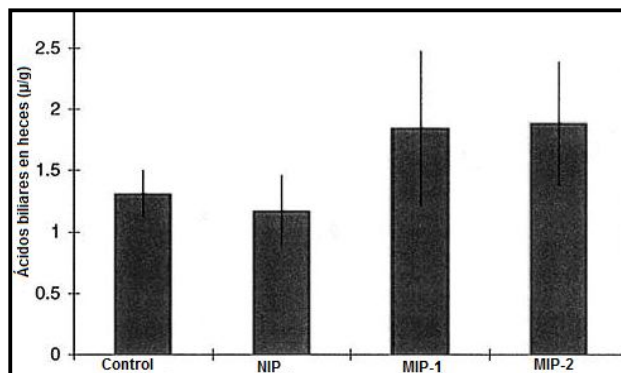


Figura 5. Resultados de la excreción de ácidos biliares en hamsters después de la administración del polímero, al control no se le administró el polímero<sup>9</sup>.

Este estudio ha establecido las bases para utilizar los polímeros impresos para disminuir los niveles de moléculas implicadas en alguna enfermedad como por ejemplo el colesterol<sup>9</sup>.

Otras de las aplicaciones de los polímeros de impresión molecular son como catalizadores. Se ha demostrado que si se obtienen anticuerpos para moléculas similares al estado de transición de una reacción química, pueden ser empleados como catalizadores de la misma, basándose en este principio, otros autores diseñaron y sintetizaron materiales impresos con análogos estructurales, de forma que los polímeros obtenidos pueden ser empleados como catalizadores<sup>60</sup>.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

- ❖ Sintetizar un polímero de impresión para el fármaco ivermectina a partir del ácido metacrílico (MAA) y el triacrilato de pentaeritrol (PETA), y evaluarlo *in vivo* como posible sistema para evitar el daño de la ivermectina al ambiente.

### 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Sintetizar el polímero de impresión molecular de ivermectina utilizando como monómero funcional al MAA y al PETA como entrecruzador, vía radicales libres.
- ❖ Elaborar bolos orales que contenga el polímero de impresión, para administrar a borregos.
- ❖ Evaluar el efecto del polímero de impresión contenido en los bolos al ser administrados por vía oral a los borregos previamente tratados con ivermectina, obteniendo muestras de estiércol que serán colocadas en terrarios para evaluar su efecto sobre los escarabajos de la especie: *Scarabaeidae, Scarabaeinae*.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1. Materiales y equipos

Espectrofotómetro UV-Visible HEWLETT-PACKARD 853, software HP-845x-Visible System.

Desecador, P-SELECTA.

Bomba de vacío, COMETA.

Lámpara, OSRAM, 400 W, Blanco de lujo.

Baño recirculador con enfriamiento, Thermo electron corporation Neslab RTE7.

Parrilla de calentamiento con agitación, IKA WORKS® USA.

Rotavapor, Buchi

Molino analítico. Cole-Parmer.

Ivermectina, Moléculas Finas de México S.A de C.V,

Triacrilato de pentaeritrol (PETA), ALBRICH

2,2'-azobisisobutironitrilo ( AIBN), Perkadox

Ácido metacrílico(MMA), SIGMA

Cloroformo RA.

Etanol purificado por destilación, Reactivos y Productos Químicos Finos.

Ivergold 3.5 L.A. Química FARVET.

Harina de trigo, Golden Hills.

Sabor manzana, Sabores y Colores Schiemann. S.A de C.V

Agua destilada.

Gas Nitrógeno Comprimido, PRAXAIR.

## 5.2. Metodología

### 5.2.1. Síntesis del polímero de impresión molecular

La síntesis de polímero se realizó por el método por bloques, el cual consiste en colocar en un recipiente adecuado la mezcla de reactivos para obtener el polímero, se realizó la síntesis del polímero de impresión molecular con las siguientes relaciones estequiométricas: una mol de ivermectina (IVM) como horma, 4 moles de ácido metacrílico (MMA) como monómero funcional, 20 moles del triacrilato de pentaeritrol (PETA) como entrecruzador y 0.04 moles del 2,2'-azobisisobutironitrilo (AIBN) como iniciador, este polímero será nombrado como MIP-IVM-UV, también se realizó la síntesis del polímero no impreso (NIP-UV) en la mismas relaciones estequiométricas, omitiendo la adición de la horma(IVM). Las proporciones de ivermectina, MMA, PETA y AIBN se utilizaron, ya que en un trabajo previo se obtuvieron resultados donde este polímero tuvo una alta capacidad de reconocimiento y recuperación de ivermectina <sup>61</sup>.

#### 5.2.1.2. Síntesis del MIP-IVM-UV

La síntesis del MIP y NIP se realizó mediante la polimerización vía radicales libres, para esto se utilizó el siguiente procedimiento:

(a) Se pesaron 875.1 mg (1 mmol) de ivermectina la cual se disolvió en 3 ml de cloroformo, una vez disuelta se añadió 340  $\mu$ L (4 mmol) de ácido metacrílico y 5.11mg (20 mmol) de triacrilato de pentaeritrol, se agitaron por 5 min y se adicionó 7.2 mg de AIBN previamente disuelto en 0.5 ml de cloroformo se continuó la agitación otros 5 min. (b) La mezcla de reacción se colocó en un tubo de ensayo tapado, en donde se burbujeo N<sub>2</sub> durante 5 minutos, (c) concluido los 5 minutos, el tubo se selló y colocó en un baño a 4 °C en presencia de luz ultravioleta durante 24 horas, la síntesis de NIP se realizó en las mismas condiciones, omitiendo la adición de la ivermectina (figura 6).

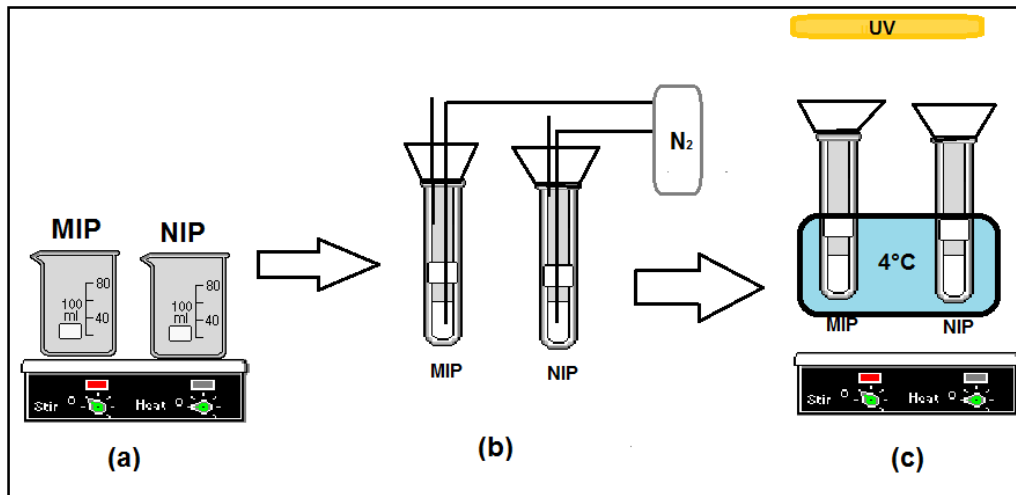


Figura 6. Síntesis del MIP-IVM-UV y NIP-UV

- Reacción de polimerización

En general la síntesis de MIP implica primero la formación de complejos en la disolución de una molécula molde (IVM) con monómeros funcionales (MMA), a través de enlaces no covalentes, en nuestro caso, puentes de hidrógeno, seguida por una polimerización de estos monómeros alrededor de la molécula molde con la ayuda de un entrecruzador (PETA) y en presencia de un iniciador (AIBN) figura 7.

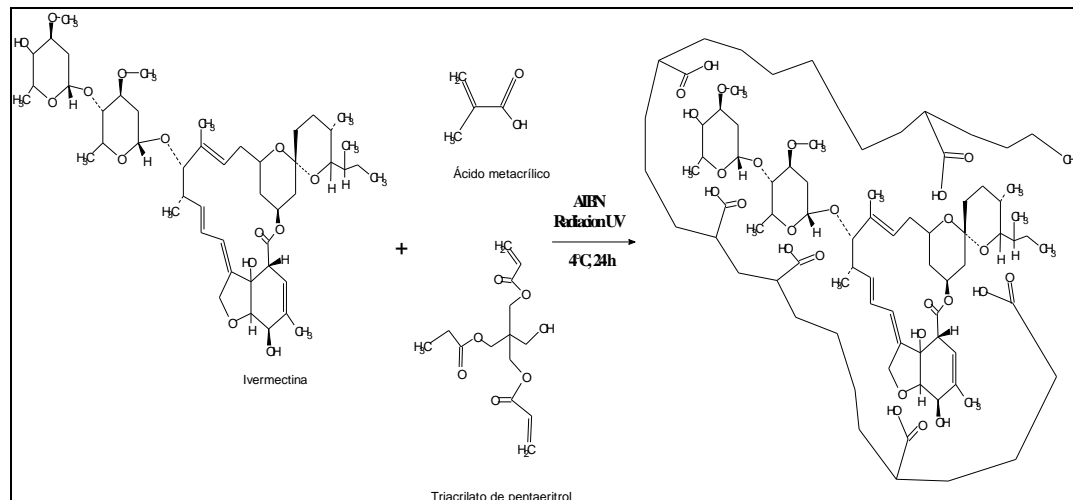


Figura 7. Reacción de polimerización, utilizando como monómero funcional el ácido metacrílico.

### 5.2.1.3. Eliminación de la ivermectina de los polímeros

Una vez obtenidos el MIP y el NIP, se trituraron en un molino analítico eléctrico, Cole-Parmer, hasta obtener un polvo fino a éste se realizaron lavados sucesivos con etanol con el fin de eliminar la ivermectina, disolvente, iniciador, oligómeros de bajo peso molecular e impurezas del polímero impreso y de esta forma dejar disponibles las cavidades complementarias a la ivermectina formadas en la reacción de polimerización (Figura 8). Los lavados se hicieron de la siguiente manera; los polímeros se colocaron en 30 mL de etanol con agitación por un lapso de 2 horas, después de la cuales el etanol se elimina por decantación, este procedimiento se repitió 3 veces, terminados los lavados con los 30 mL de etanol, los polímeros se colocaron en un soxhlet con etanol durante 72 horas, una vez terminado el lavado en el soxhlet, se efectuaron 2 lavados adicionales con 30 ml de etanol durante 24 horas. Después los polímeros se filtraron y se colocaron en un desecador a 50 °C y presión de 30mmHg durante 24 horas, durante todo el proceso de lavado se obtuvieron espectros de UV del etanol residual de los lavados para comprobar que los polímeros quedaran libres de ivermectina y otras impurezas.

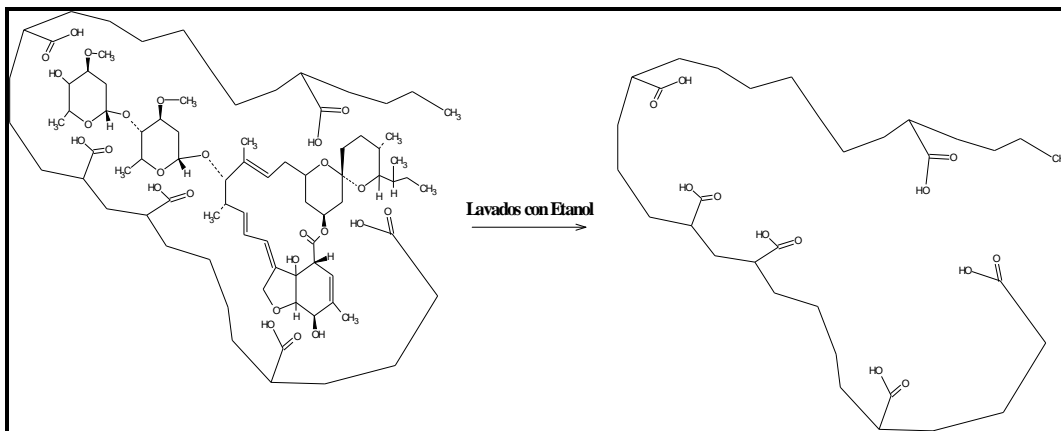


Figura 8. Eliminación de la ivermectina.

### 5.2.1.4. Carga de ivermectina en los polímeros

Para calcular la cantidad de polímero limpio (libre de ivermectina e impurezas) que se les debe dar a los borregos tratados con ivermectina, se debe conocer cual es la cantidad de ivermectina que es capaz de atrapar el MIP, este dato se obtiene calculando la carga del polímero.



Con los polímeros limpios y secos, se realizó la carga de ivermectina en los polímeros, para lo cual se colocaron 50 mg del MIP y NIP en contacto con 25 ml de una disolución saturada de ivermectina en matraces sellados con agitación constante durante 48 horas, se determinó la concentración de la ivermectina en la solución saturada al inicio y al final por espectroscopia de UV, esto se realizó extrapolando las absorbencias obtenidas a 245 nm en una curva patrón de ivermectina, al final de la reacción los polímeros se filtraron, se secaron y pesaron.

La carga del polímero se obtuvo de la siguiente manera: la diferencia de la concentración final menos inicial se multiplicó por el volumen utilizado de disolución saturada, con lo que se obtiene la cantidad de ivermectina en miligramos que fue atrapada por el polímero, al dividir los miligramos de ivermectina captada entre los miligramos de polímero utilizado se obtiene la carga del polímero

$$Carga\ del\ polímero = \frac{mg_{ivermectina\ recuperada}}{mg_{polímero}}$$

#### **5.2.1.5. Sistema de administración del polímero *in vivo***

Obtenida la cantidad de ivermectina que el polímero puede captar, y considerando la dosis de ivermectina utilizada en el ganado (200 µg de IVM/ kg de peso), se comenzaron a elaborar bolos con una concentración MIP y NIP de 50 mg, respectivamente. Esta cantidad de polímero puede captar la ivermectina utilizada en el tratamiento de un borrego con un peso de 50 kg (10 mg de ivermectina).

Los bolos se elaboraron de la siguiente manera: se pesó aproximadamente 1g de harina de trigo en un vaso de precipitados, en el mismo vaso se adicionó el polímero libre de ivermectina (sin cargar). Se preparó el bolo con una concentración de 50 mg de polímero, el polímero y la harina se mezclaron con ayuda de una espátula hasta formar una pasta, a la cual se le adicionaron aproximadamente 10 gotas de agua destilada y 2 gotas de sabor manzana, se revolvió hasta obtener una pasta. Con la pasta obtenida se moldearon los bolos y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 48 horas, al final se

etiquetaron y se almacenaron en bolsas de plástico para su posterior administración en borregos.

### 5.3. Estudios de recuperación de ivermectina *in vivo*

Los estudios de recuperación de ivermectina *in vivo* se realizaron en 7 ovinos de las razas Pelibuey y Suffolk (Figura 9) con un peso aproximado de 50 kg con edades que oscilan de 1 a 6 años. Los borregos fueron proporcionados por el Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPICSA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, ubicado en el kilómetro 28.5 de la carretera federal México-Cuernavaca, a 19° latitud norte y 99° longitud oeste a una altura de 2760 metros sobre el nivel del mar. El clima de la región es semifrío, semihúmedo con lluvias en verano y con una precipitación pluvial de 800 a 1200 milímetros anuales y una temperatura promedio de 19 °C.



Figura 9. Ovinos raza Suffolk (izquierda) y raza Pelibuey (derecha)

#### 5.3.1. Administración del polímero

Para la administración de los polímeros sin cargar los borregos se dividieron en 3 grupos como se muestra en la siguiente tabla 7

Tabla 7.				
grupo	Individuos	Ivermectina(Vía SC )	NIP	MIP
<b>Control</b>	1 borrego	35mg	-	-
<b>Prueba NIP</b>	3 borregos	35mg	50 mg	
<b>Prueba MIP</b>	3 borregos	35mg		50 mg

En el día cero sólo se administró 1 ml de IVERGOLD 3.5 L.A. (Química FARVET) equivalente a 35mg de ivermectina a todos los grupos, la ivermectina se aplicó por vía subcutánea, los bolos con polímero se comenzaron administrar por vía oral 24 horas post-tratamiento (hpt) con ivermectina durante 4 días en intervalos de 24 horas por lo tanto en el día 0 se administró la IVM y en los días 1, 2, 3 y 4 se administró el bolo. Es importante recordar que el medicamento administrado confiere un efecto de larga acción, la protección contra los parásitos es de 42 días.

#### **5.3.1.2. Recolección de muestras de heces**

Se tomaron muestras de heces *per rectum* de cada uno de los animales, en los días: 0 (administración de la ivermectina), 1, 2, 3, 4, 8, 15, 22, 23, 24 y 25 (dpt), el medicamento esta formulado con un vehículo que le confiere un lenta liberación durante 42 días por lo que la ivermectina se eliminara en heces aun después de 42 días. Las muestras se almacenaron en bolsas de plástico en refrigeración hasta su utilización en el bioensayo en escarabajos.

#### **5.3.1.3. Efecto de la interacción polímero de impresión ivermectina contenidos en heces de borregos sobre los escarabajos**

Se realizó un bioensayo con escarabajos de la especie Scarabaeidae; Scarabaeinae, los cuales fueron recolectados en Topilejo, Morelos y colocados en terrarios a una temperatura de 20 °C y 40 % de humedad donde la superficie estaba compuesta de mezcla de arena de playa, vermiculita y tierra de jardín en las mismas proporciones, los escarabajos se dividieron en seis grupos los cuales fueron expuestos heces de los borregos recolectadas (para las muestras de heces obtenidas de 3 borregos se utilizó un mezcla de estas), como se indica en la tabla 8:

Tabla 8.					
TERRARIO	LARVAS*	PUPAS*	ADULTOS*	Muestra de heces	Polímero administrado
<b>1 A</b>	22	8	21	3 dpt	NIP
<b>2 B</b>	28	10	25	3 dpt	MIP
<b>3 C</b>	31	11	27	3 dpt	NA
<b>4 D</b>	19	16	29	15 dpt	NIP
<b>5 E</b>	14	17	20	15 dpt	MIP
<b>6 F</b>	27	9	18	15 dpt	NA

NA= no administrado. \*Número de individuos al inicio del bioensayo.

Se registró el número de escarabajos y larvas muertas en los días 0,3,12,15,20,21,27,28,30,35 y 41 para los terrarios 1 A, 2 B y 3 C y los días 0,3,6,7,9,15 y 22 para los terrarios 4 D, 5 E y 6 F, al final se realizó un conteo de larvas y adultos sobrevivientes, lo que nos permitió conocer el número de larvas que mudaron a pupas y pupas que alcanzaron el estado adulto, se tomaron fotografías y video de los días en los que se realizaron los conteos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Síntesis del polímero impreso de ivermectina y el polímero no impreso

Se realizó la síntesis del polímero impreso (MIP) y del no impreso (NIP), éste último funciona como blanco ya que en éste no está presente la molécula molde (ivermectina) en el momento de polimerización. Por lo tanto en el polímero no impreso no se forman cavidades específicas para la ivermectina, por lo que al utilizar el NIP se puede comprobar la afinidad y la formación de los sitios de reconocimiento presente en el MIP debido a la impresión por la molécula molde formada durante el proceso de polimerización.

Se sintetizó el polímero de impresión molecular al cual se designó como MIP-IVM-UV y el NIP-UV, el nombre hace referencia a la ivermectina que fue la molécula utilizada como molde y al método utilizado para la iniciación de la polimerización, en este caso fue la luz ultra violeta (UV).

Los polímeros obtenidos en bloque antes de ser molidos presentan una clara diferencia entre el MIP-IVM-UV y el NIP-UV, se observa que para el caso del MIP se obtiene un sólido de color blanco y translucido para el NIP, estas diferencias se puede atribuir que en el caso de MIP-IVM-UV existe la formación de cavidades donde se encuentra la ivermectina lo cual provoca que la luz sea dispersada (figura 10), lo que no sucede en el caso de NIP-UV ya que no contiene la molécula molde.

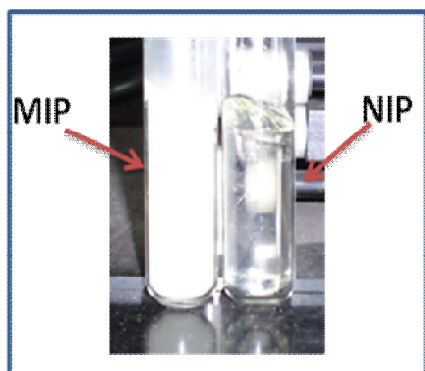
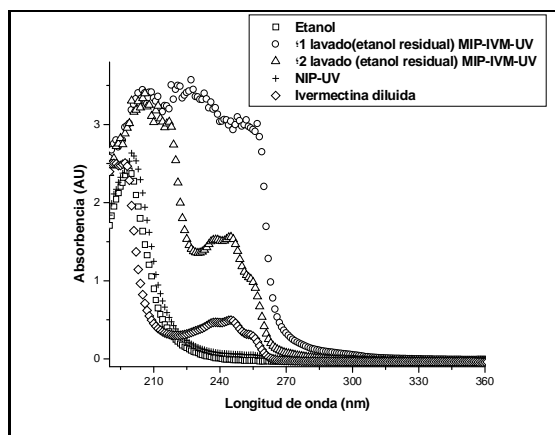


Figura 10. Polímeros MIP-IVM-UV Y NIP-UV.

Después de ser molidos se obtiene un polvo fino de color blanco tanto en el caso del polímero impreso como en el no impreso, estos polvos no presentan ninguna diferencia física, por lo que es importante mantenerlos bien identificados, después de obtener los polvos se procedió a los lavados con etanol con el fin de eliminar la ivermectina.

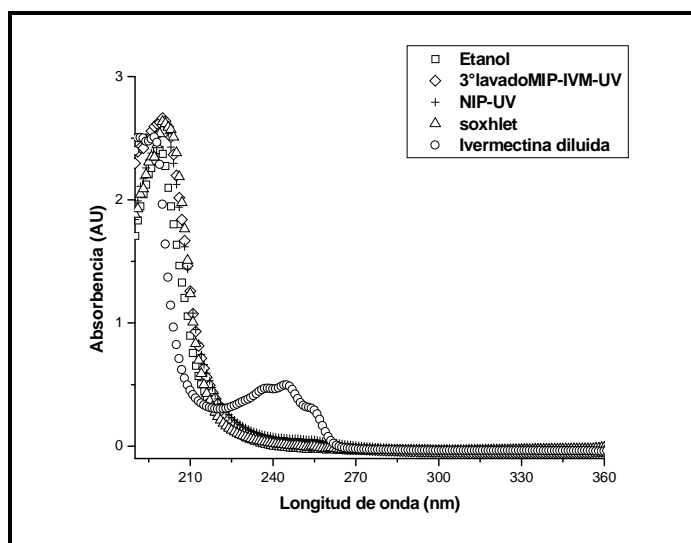
### 6.1.1. Eliminación de la ivermectina

Se realizaron lavados sucesivos con etanol, con el fin de eliminar la ivermectina y así tener las cavidades libres formadas durante el proceso de impresión, este proceso es el más tardado ya que se requirieron 72 h para poder obtener el polímero libre de ivermectina, los lavados se llevaron a cabo tanto al polímero impreso como al no impreso ya que el NIP debe ser sometido a las mismas condiciones que su respectivo MIP para que puede ser comparados, además que en estos lavados no sólo se elimina la ivermectina si no también restos de reactivos que no se incluyeron en la matriz polimérica: disolvente, monómero, entrecruzador e iniciador. El proceso de lavado del MIP-IVM-UV y del NIP-UV se siguió por espectrometría de UV, en la gráfica 5 se muestra el espectro del etanol utilizado en el primer lavado del MIP y el del etanol utilizado en el segundo lavado, los lavados del se realizaron en un intervalo de dos horas, también e se muestra el espectro del etanol utilizado en el lavado del NIP y como referencia se muestra el espectro del etanol y de una solución de ivermectina en etanol.



Gráfica 5. Espectros del etanol residual del primer y segundo lavado, etanol y del etanol de residual del NIP

En la gráfica 5 es posible observar que los espectros del etanol del primer lavado aparece saturado de ivermectina lo que nos revela que una gran cantidad de ivermectina fue removida del MIP en este primer lavado, en el segundo lavado se obtiene un señal menor lo que indica que la ivermectina está siendo removida del polímero impreso, en el tercer lavado la señal de la ivermectina se ve claramente disminuida y después de lavar los polímeros en el soxhlet el espectro de la etanol utilizado en este lavado es similar al del etanol, gráfica 6.



Gráfica 6. Etanol de tercer lavado y del lavado en soxhlet.

El rendimiento obtenido después de los lavados es de 75.77%.

Una vez terminados los lavados, se obtiene el MIP libre de ivermectina se cargo con ivermectina para conocer la cantidad que el polímero puede captar del fármaco.

### 6.1.2. Cargado de ivermectina en los polímeros

La carga del polímero se calculó con la siguiente ecuación: carga del polímero= mg de ivermectina/mg de polímero, obteniéndose los resultados que se muestran tabla 9:

**Tabla 9.**

<b>Polímero</b>	<b>Carga del polímero (mg/mg) [Ivermectina enlazada /Polímero]</b>
<b>MIP-IVM-UV</b>	2.1545
<b>NIP-UV</b>	1.4415

El polímero impreso tiene una recuperación mayor que su respectivo polímero no impreso lo que indica el MIP tiene sitios de reconocimiento que favorecen la recuperación de la ivermectina.

## **6.2. Administración del polímero e ivermectina, y recolección de la muestras de heces**

La administración de la ivermectina se realizó con éxito, ninguno de los animales presentó reacciones adversas debidas a la administración de la ivermectina, los bolos con polímero (MIP-IVM-UV Y NIP-UV) fueron administrados por vía oral, los bolos fueron comidos en su totalidad por los animales tratados.

Los bolos demostraron ser un sistema eficaz para administrar ya que aseguraban que la cantidad de polímero fuera la correcta y además de esta manera los borregos no rechazaron el polímero, debido a que la cantidad administrada de polímero es pequeña (50 mg). Esta se mezcló con 1g de harina de trigo para obtener bolos de un tamaño apropiado para que los borregos los pudieran comer, además que la adición del sabor manzana permitió la aceptación por parte de los borregos. En un futuro se pretende que el polímero pueda ser adicionado como un complemento en el alimento de los borregos para poder ser administrado durante el tratamiento con ivermectina, cabe destacar que el polímero de impresión molecular es estable en las condiciones de experimentación.



---

---

### 6.3 Resultados terrarios 1 A, 2 B y 3 C

#### 6.3.1. Efecto de la interacción polímero-ivermectina en heces de borrego sobre los escarabajos adultos

Se realizaron conteos a diferentes intervalos de los escarabajos y larvas muertas durante el transcurso del bioensayo. Se calculo el número de escarabajos y larvas vivas de los terrarios 1 A, 2 B y 3 C, esta cantidad se obtuvo restando el numero de escarabajos y larvas muertas al numero de individuos vivos al inicio de bioensayo, el numero escarabajos adultos vivos en los días de conteo se muestran en la gráfica 7, en ésta se observa una clara disminución del número de escarabajos en el terrario 3 C en este terrario los escarabajos fueron expuestos a muestras de heces del borrego tratado con ivermectina (control) las cuales fueron obtenidas a los tres días posteriores a la administración del medicamento IVERGOLD 3.5 L.A. Al borrego utilizado como control no se le administró el polímero por lo que en la heces la ivermectina debe de estar presente de forma libre, por lo que en este terrario se observó una disminución del número de escarabajos, la cual se hace evidente en el día 21, ya que en este día todos los escarabajos murieron, uno de los factores a considerar es que en este día la concentración de la ivermectina presente en las heces alcanzó concentraciones letales debido a la acumulación de materia fecal en el terrario, como consecuencia de que se colocaba aproximadamente un 1g de muestra cada 7 días para mantener alimentados a los escarabajos.

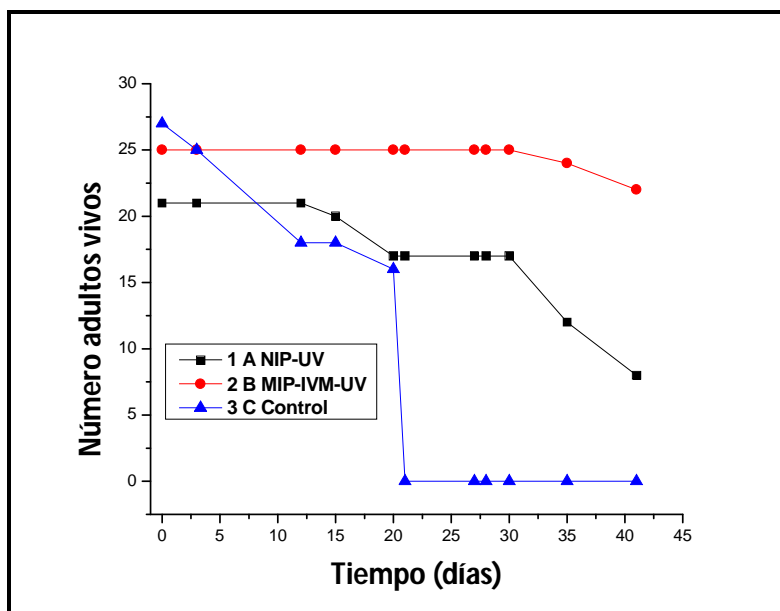
Hay que recordar que la degradación de los fármacos en el suelo se ve afectada por las condiciones ambientales (temperatura, pH, tipo de suelo y presencia de bacterias degradadoras) y que la vida media de degradación de la ivermectina puede ir desde semanas hasta meses, dependiendo de las condiciones ambientales. Además se debe considerar que no hubo disipación del fármaco debido a que el suelo permanece estancado dentro del terrario.

En la tabla 10 se observa que para el caso del terrario 2 B, la disminución de número de escarabajos no se presenta hasta el día 30; aunque a partir de este día la disminución no es tan drástica como en el caso del terrario 3 C esto se puede deber a una muerte natural, en este terrario se colocaron muestras de

## RESULTADOS

los borregos tratados con ivermectina y a los que se les administró el bolo que contenía 50 mg del polímero impreso MIP-IVM-UV a las 24 hpt, 48 hpt, 72 hpt y 96 hpt, y las muestra fueron recolectada a los 3 dpt, por lo que en el tracto gastrointestinal de los borregos se encontraba el polímero, el cual atrapó la ivermectina presente ahí por lo tanto al ser excretada en la heces este fármaco ya se encontraba atrapado por el polímero, haciéndolo menos biodisponible a los escarabajos y por lo tanto disminuyó su efecto nocivo.

<b>Tabla 10.</b>			
Numero de escarabajos vivos			
<b>días</b>	terrario 1 A NIP-UV	terrario 2 B MIP-IVM-UV	terrario 3 C CONTROL
<b>0</b>	21	25	27
<b>3</b>	21	25	25
<b>12</b>	21	25	18
<b>15</b>	20	25	18
<b>20</b>	17	25	16
<b>21</b>	17	25	0
<b>27</b>	17	25	0
<b>28</b>	17	25	0
<b>30</b>	17	25	0
<b>35</b>	12	24	0
<b>41</b>	8	22	0



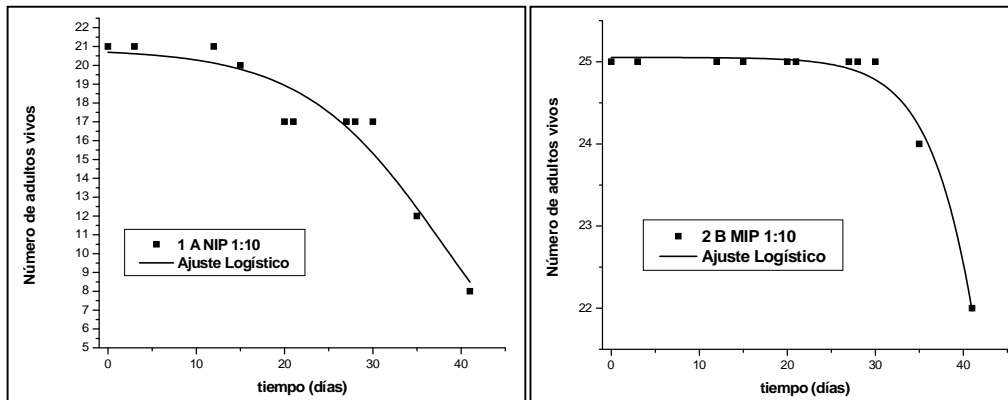
**Gráfica 7. Número de escarabajos adultos vivos respecto al tiempo de los terrarios 1 A (línea negra), 2 B (línea roja) y 3 C (línea azul).**

Para el terrario 1 A se puede observar una disminución de número de adultos; si bien la disminución no es tan evidente como en el terrario 3 C, si es mayor que la del terrario 2 B (gráfica 7), en este terrario se colocaron las muestras recolectadas a los 3 dpt de los borregos tratados con ivermectina y que se les administró el polímero no impreso (NIP-UV) a las 24 hpt, 48 hpt, 72 hpt y 96 hpt, por lo que las heces contienen el polímero no impreso y la ivermectina; aunque el polímero no impreso no presenta sitios de reconocimiento específicos para la ivermectina, si puede formarse interacciones no covalentes, principalmente puentes de hidrogeno, por lo que la ivermectina pudo ser atrapada por el NIP lo que provocó un disminución del efecto nocivo de la ivermectina, aunque este efecto en la disminución de la toxicidad es mucho menor comparada con el MIP que fue moldeado y tiene sitios específicos de mayor constante de asociación. Esto pone de manifiesto el reconocimiento molecular del MIP hacia la ivermectina.

Se realizó un ajuste logístico con los datos de los terrarios 1 A, 2 B y 3 C utilizando la ecuación de la tabla 11, con esta ecuación podemos ajustar una curva lo que no permite interpolar para poder obtener los valores de los tiempos letales 50, en este modelo las constantes obtenidas no tienen

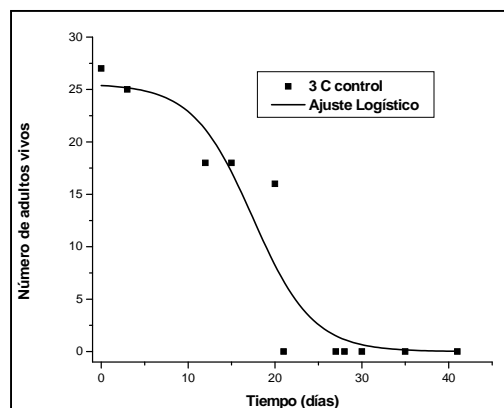
## RESULTADOS

significado físico por lo tanto no se consideran para el análisis. Los TL 50 nos permite comparar la supervivencia de los escarabajos y el efecto que produce la administración del MIP y el NIP a borregos previamente tratados con ivermectina. Para los datos obtenidos de los terrarios, el mejor modelo fue el logístico, se probaron varios modelos y se escogió este ya que tuvo el mejor ajuste (en el anexo 1 se muestra la información del ajuste realizado con el software OriginPro 8), con la finalidad de poner obtener el TL 50 el cual nos permite comparar los resultados. En el gráfico 7.1 se muestran los ajustes realizados, en la tabla 11 los valores de las constantes obtenidas en los ajustes con estos valores y utilizando la ecuación del modelo es posible calcular el TL50.



a. Terrario 1A

b. Terrario 2B



c. Terrario 3C

Gráfico 7.1. Ajustes de los terrarios 1 A, 2 B y 3 del número de adultos vivos.

Tabla 11.				
	Valores			Ecuación
Constantes	1 A NIP 1:10	2 B MIP 1:10	3 C Control	
a (días)	20.85	25.05	25.54	$y = \frac{a}{1 + e^{-k(x-xc)}}$
xc ( número de escarabajos vivos)	38.03	49.46	17.44	
k (días)	-0.012	-0.231	-0.289	

De los ajustes realizado en el gráfico 7.1 es posible calcular el Tiempo Letal 50 (TL 50) que es el tiempo transcurrido en días en donde el 50% de los escarabajos han muerto, los cálculos se realizaron utilizando la ecuación de la tabla 12, en donde (y) se sustituye por el valor en donde la mitad de los escarabajos han muerto y las demás constantes son las de la tabla 11. Comparando estos valores es posible ver que el terrario 3 C, en donde los escarabajos fueron expuestos a las muestra de heces que contenían ivermectina, es menor que el valor obtenido en los terrarios 1 A y 2 B en donde la muestras además de tener la ivermectina contenían el NIP 1:10 y el MIP 1:10 respectivamente; el valor de TL 50 más alto fue del terrario 2 B donde los escarabajos estuvieron expuestos a la interacción Ivermectina- MIP este valor tuvo que ser estimado en el ajuste realizado ya que en el intervalo de tiempo en el que se realizó el experimento no fue posible determinar este valor, ya que más de 50% de la población permaneció viva al terminar el estudio, los TL50 se muestran en la tabla 12. Cabe destacar que los escarabajos mueren en este terrario por causas naturales más que por la acción de la ivermectina, es decir, el MIP protege totalmente a los escarabajos.

Tabla 12.		
Terrario	y [escarabajos muertos]	TL50 * (tiempo letal 50) [días]
<b>1 A NIP 1:10</b>	10.5	37**
<b>2 B MIP 1:10</b>	12.5	49.5**
<b>3 C Control</b>	13.5	17**

$$y = \frac{\ln(y) - \ln(a - y)}{k} + x_c$$

\*TL50: Es el tiempo transcurrido hasta que el 50 % de la población muere.

\*\* Valores estimados del ajuste

En la figura 11, se muestran fotos de los terrarios 1 A, 2 B y 3 C del día 21, este es el día en el que se presentó la muerte de todos los escarabajos en el terrario 3 C, en la foto se observan 8 escarabajos negros y uno de color café muertos sobre la superficie del terrario, los demás escarabajos no se observan ya que se encuentran enterrados, pero el terrario se mantuvo en observación para descartar que siguieran vivos; los escarabajos de este terrario se alimentaron con estiércol del borrego tratado previamente con ivermectina y al cual no se le administró ningún polímero, por lo que la ivermectina fue excretada en el estiércol de forma libre. En las fotos de los terrarios 1 A y 2 B se pueden observar escarabajos vivos en la superficie y también se observó movimiento debajo de la tierra lo que nos indica que había individuos vivos enterrados, en estos terrarios se colocaron muestras de heces de animales previamente tratados con ivermectina, pero que también se les administró el polímero no impreso en el caso del terrario 1 A y en el terrario 2B se colocaron las muestras de los borregos a los que se le dio el polímero impreso, la presencia de escarabajo vivos en estos terrarios es evidencia de que la administración del MIP-IVM-UV y el NIP-UV redujo el efecto nocivo de la ivermectina. Mientras que en el terrario 3 C todos los escarabajos están muertos, esto debido al efecto nocivo de la ivermectina contenida en el estiércol del borrego.

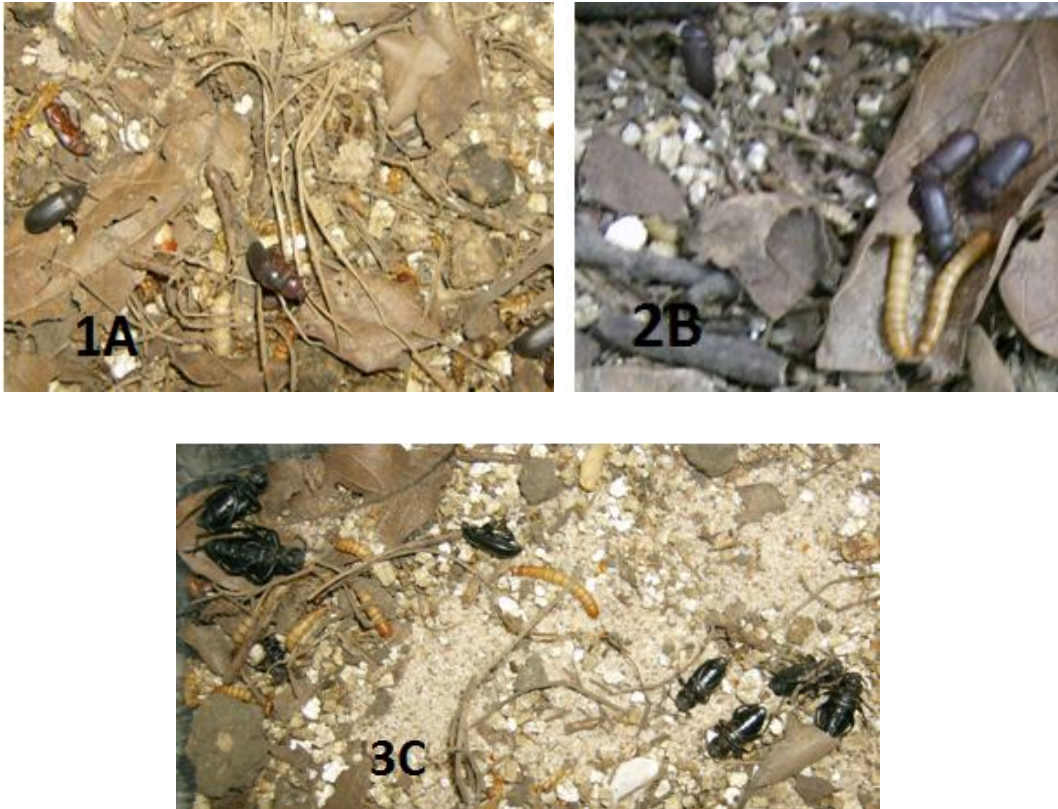


Figura 11. Fotografías de los Terrarios 1 A heces con ivermectina y NIP , 2 B heces con ivermectina y MIP y 3 C heces con ivermectina , al día 21.

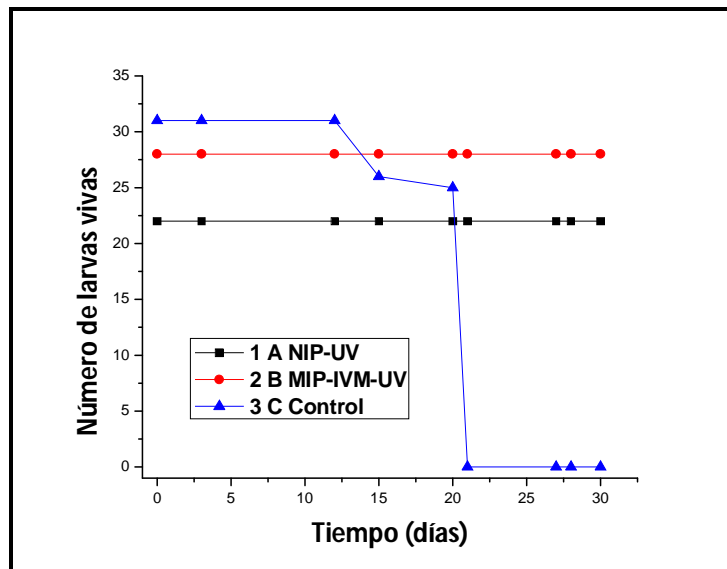
### 6.3.2. Efecto de la interacción polímero-ivermectina en heces de ganado sobre las larvas de escarabajo

Se realizó el conteo de larvas muertas los mismos días que el conteo de los escarabajos adultos (tabla 13), en la gráfica 8 se muestra el número de larvas vivas respecto al tiempo, se observa que para el terrario 3 C (en este terrario se colocaron las muestras del borrego que recibió únicamente el tratamiento con ivermectina) la muerte de todas las larvas se presenta en el día 21, que es el mismo día en donde se presenta la muerte de todos los escarabajos adultos, por lo tanto la concentración de ivermectina libre presente en el estiércol de borrego alcanzó concentraciones que fueron letales tanto para los escarabajos adultos y las larvas. Como se había mencionado anteriormente estas concentraciones pudieron ser alcanzadas debido a la acumulación del estiércol

en el terrario, estudios han demostrado que las larvas son más sensibles a la presencia de fármacos en el estiércol y suelo<sup>27,29</sup>.

**Tabla. 13**

NUMERO DE LARVAS VIVAS			
días	Terrario 1 A NIP-UV	Terrario 2 B MIP-IVM-UV	Terrario 3 C CONTROL
0	22	28	31
3	22	28	31
12	22	28	31
15	22	28	26
20	22	28	25
21	22	28	0
27	22	28	0
28	22	28	0
30	22	28	0



Gráfica 8. Número de larvas vivas respecto al tiempo de los terrarios 1 A (línea negra), 2 B (línea roja) y 3 C (línea azul).



En el terrario 2 B, las larvas fueron expuestas a heces que contenían ivermectina y el MIP-IVM-UV, en consecuencia la ivermectina se encontraba atrapada en el polímero encontrándose menos biodisponible por lo que su efecto tóxico se debería ver disminuido; en la gráfica se observa que en este terrario no hubo muerte de larvas en ninguno de los días que duro el estudio por lo que la ivermectina que es atrapada por el polímero es menos nociva que la ivermectina eliminada de forma libre. En el terrario 1 A se colocaron las muestras de estiércol donde está presente el polímero no impreso (NIP –UV) y la ivermectina; si bien el NIP- UV puede interactuar con la ivermectina, estas interacciones no son tan específicas como la que se dan en el caso del polímero impreso, por lo cual es posible que la ivermectina fuera atrapada por el polímero no impreso observando el mismo resultado que con el polímero impreso donde no hubo muertes de larvas.

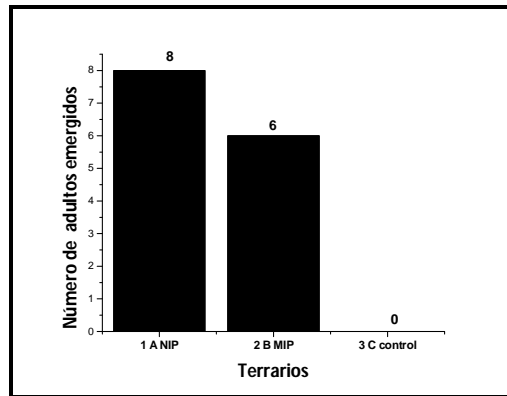
- **Pupas que alcanzaron el estado adulto**

En la gráfica 9, se muestra el número de pupas que alcanzaron el estado adulto, las pupas son un estado inactivo del ciclo de vida de los escarabajos, en el estado pupar no existe alimentación, lo que ocurre es una reorganización de órganos y sistemas orientadas a la conformación de lo que será el individuo adulto. En el terrario 3 C la ivermectina presente en el estiércol afectó de manera importante el número de escarabajos emergidos, por lo que no hubo individuos que formaran la nueva generación de escarabajo adultos, lo que afecta de manera directa el ciclo de vida de los escarabajos

Para el terrario 2 B, se puede observar en la grafica 9 que seis de las diez pupas alcanzaron el estado adulto. En este terrario se colocaron muestras de los borregos tratados con ivermectina y a los que se les administró el bolo que contenía 50 mg del polímero impreso MIP-IVM-UV a las 24 hpt , 48 hpt, 72 hpt y 96 hpt, y las muestra fueron recolectadas a los 3 dpt, por lo tanto la interacción MIP-Ivermectina reduce el efecto nocivo de la ivermectina sobre esta etapa del ciclo de vida del escarabajo, también la interacción NIP-Ivermectina logró reducir el efecto del fármaco, en esta etapa las ocho pupas iniciales lograron alcanzar el estado adulto. Estos solo nos indican que el polímero disminuye el efecto nocivo de la ivermectina sobre las pupas, pero no

se puede decir que el polímero no impreso en este caso sea mejor que el impreso.

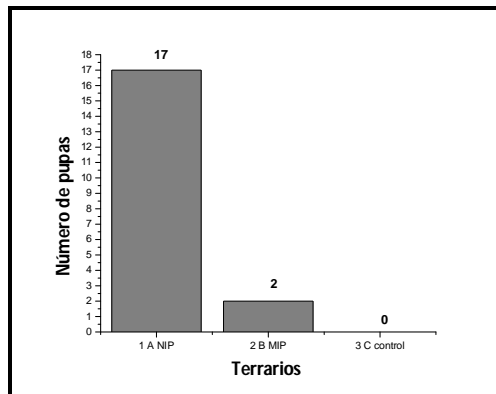
El realizar el conteo del número de individuos al inicio y al final del estudio nos permite conocer el efecto potencial de la ivermectina en diferentes etapas del ciclo de vida.



Gráfica 9. Número de pupas que alcanzaron el estado adulto.

- **Larvas que mudaron a pupa**

En la gráfica 10, se puede observar que la ivermectina contenida en el estiércol de borrego afecta de manera importante la etapa en que las larvas mudan a pupa, en el terrario 3 C ninguna larva mudo a pupa, con lo que se afecta de manera directa la siguiente generación de escarabajos, ya que como se había mencionado antes se afecta el ciclo de vida de los escarabajos.



Gráfica 10. Número de larvas que mudaron a pupas.

En el terrario 2 B; aún cuando sólo 2 de las 28 larvas mudaron a pupa, sí se completó una de las etapas del ciclo de vida, lo que permite mantener la siguiente generación de escarabajos. El terrario 1 A fue donde más larvas mudaron a pupas. En este terrarios colocaron las muestras de los borregos tratados ivermectina y que se les administró el polímero no impreso (NIP-UV), aunque el número de larvas que mudaron a pupas es mayor que en el terrario 2 B, esto no significa que en el terrario 1 A el polímero no impreso disminuya el efecto nocivo de la ivermectina de forma más efectiva que el polímero no impreso, en el resultado se debe considerar que el tiempo que duran en este estado es 30- 52 días. Por lo que en el terrario 1 A, las larvas que estaban listas para mudar a pupa debieron ser más que las del terrario 2 B.

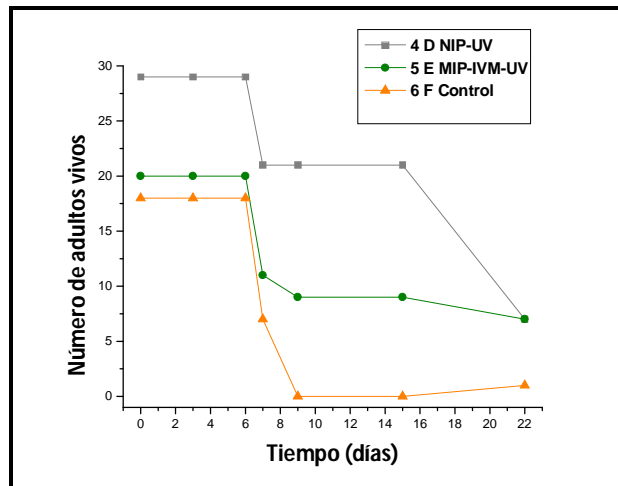
### **6.3.3. Resultados terrarios 4 D NIP-UV, 5 E MIP-IVM-UV y 6 F CONTROL, permanencia del polímero en el tracto gastrointestinal del borrego.**

Los terrarios 4 D NIP- UV, 5 E MIP-IVM-UV y 6 F Control fueron expuestos a muestras recolectadas a los 15 dpt con ivermectina, a los grupos prueba MIP y prueba NIP se les administró el polímero correspondiente en los días 1, 2 ,3 y 4 dpt por lo que en este ensayo se determina si los polímeros pueden permanecer en el tracto gastrointestinal y de esta forma seguir atrapando a la ivermectina evitando de esta forma el daño que este fármaco produce a la fauna del suelo.

#### **6.3.3.1. Efecto de las heces de borregos tratados con ivermectina sobre los escarabajos adultos**

En la gráfica 11 se observa que para los tres terrarios, el comportamiento es similar, no se observa diferencia en los terrarios donde se colocaron las muestras de los borregos a los que se les administró el polímero, el medicamento administrado es una formulación de larga acción, dando una

protección contra parásitos durante 45 días; debido a la liberación gradual de la ivermectina con lo que se mantienen concentraciones efectivas.



**Gráfica 11. Número de los escarabajos adultos vivos respecto al tiempo de los terrarios 4 D (línea gris), 5 E (línea verde) y 6 F (línea naranja).**

En el gráfico 11.1 se muestran los ajustes realizados de los datos de los terrarios 5 E y 6 F (en anexo 1 se muestran la información del ajuste realizado con el programa OriginPro 8), para el terrario 4 D no fue posible realizar el ajuste por tanto no se determinó el TL 50, los valores del TL 50 para los terrarios 5 E y 6 F son de 7 días en los dos casos (tabla 14) por lo que no existe una diferencia en este valor. El cálculo de los TL 50 se realizó con la ecuación 2, en donde (y) se sustituye por el valor en donde el 50% de los escarabajo han muerto (para el terrario 5E (y=10) y para el 6F (y= 9)) para y las constantes son las de la tabla 14.

$$x = \frac{\ln \frac{A_1 - A_2}{y - A_2}}{p} + \ln x_0$$

Ecuación 2

RESULTADOS

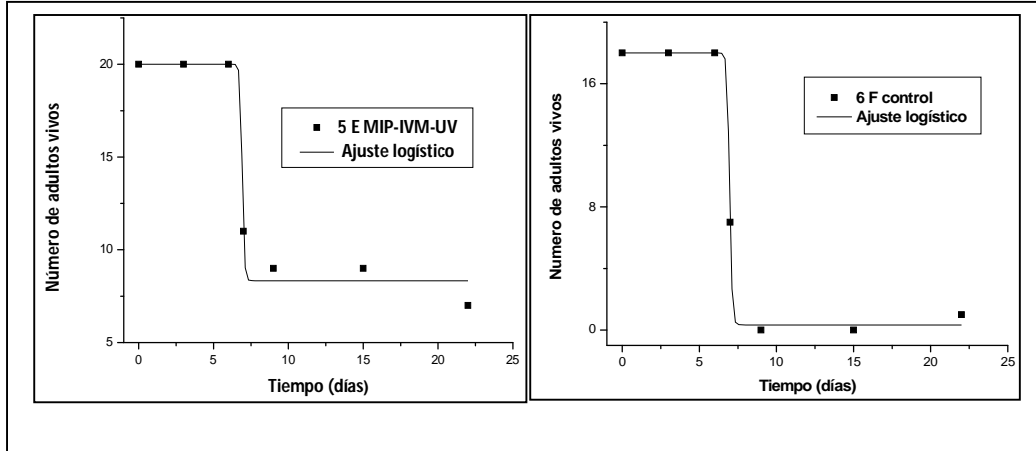


Gráfico 11.1. Ajustes logísticos de los terrarios 5 E y 6 F del número de adultos vivos

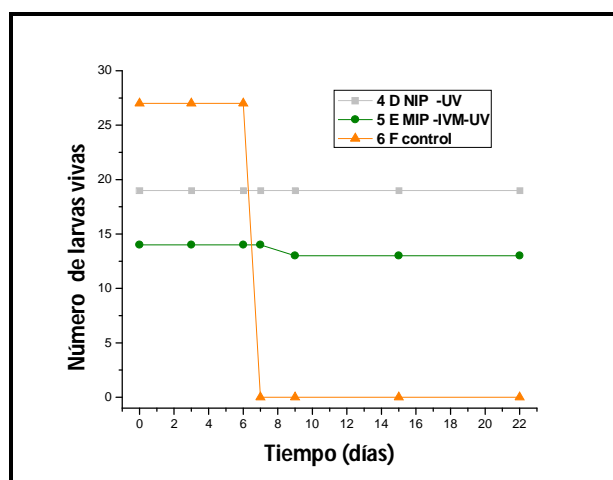
Constantes	Valor		Ecuación
	5 E MIP 1:10	6F control	
A <sub>1</sub> (número de larvas vivas )	20	18	$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{X_0}\right)^p} + A_2$
A <sub>2</sub> (número de larvas vivas )	8.33	0.33	
X <sub>0</sub> (días)	6.91	6.96	
p	98.1	87.93	
TL50 (días)	7	7	

Aunque en el terrario 5 E se colocaron las muestras de los borregos a los que se les administró el polímero, este se administró hasta el cuarto día contados a partir del tratamiento con ivermectina, los animales permanecieron 11 días sin administrarles polímero hasta la obtención de la muestra que fue a los 15 dpt, el polímero se eliminó en las heces durante los 11 días durante los cuales no se administró el polímero, en consecuencia las muestra de heces con las que se alimentaron los escarabajos, contenían ivermectina libre debido a que el

polímero no permaneció en el tracto gastrointestinal para seguir atrapando la ivermectina, al utilizar una formulación de ivermectina de acción prolongada, el polímero debe administrarse de manera constante para mantener una concentración en el tracto gastrointestinal para que la ivermectina que se elimina por las heces sea atrapada por el polímero, excretándose de esta forma con lo cual el efecto nocivo de la ivermectina sobre la fauna del suelo disminuiría.

#### **6.3.3.2. Efecto de las heces de borregos tratados con ivermectina sobre las larvas de escarabajo**

También, se evaluó la supervivencia de larvas en los terrarios 4 D, 5 E y 6 F, en el terrario 4 D se colocaron las muestras de los borrego tratados con ivermectina y que además se les administró el NIP-UV, en el terrario 5 E se colocaron las muestras de los borregos tratados con ivermectina y que además se les administró el MIP-IVM-UV y en el terrario 6 F se colocó la muestra del borrego control al cual solo se le administró la ivermectina, todas las muestras se recolectaron a los 15 dpt con ivermectina. Sólo se observó la muerte de las larvas en el terrario 6 F (gráfica 12) en el cual se colocaron las muestras del borrego tratado con ivermectina al cual no se le administró polímero, para el caso de los terrarios 4 D y 5 E durante el tiempo que duró el experimento no fue posible observar la muerte de las larvas, comparando con los datos obtenidos para los escarabajos, las larvas no se vieron afectadas en los terrarios en donde se colocaron las muestras de los borregos a los que se le administró el polímero después del tratamiento con ivermectina, como se mencionó los borregos tenían 11 días sin haber recibido el polímero (NIP o MIP) por lo que se espera que la ivermectina excretada en heces no se encuentre atrapada por el polímero, en consecuencia el efecto de esta sería evidente sobre la población de larvas ya que se ha reportado que la forma larvaria es la más sensible a los efectos de la ivermectina.



**Gráfica 12. Número de larvas vivas respecto al tiempo de los terrarios 4 D (gris), 5 E (verde) y 6 F (naranja).**

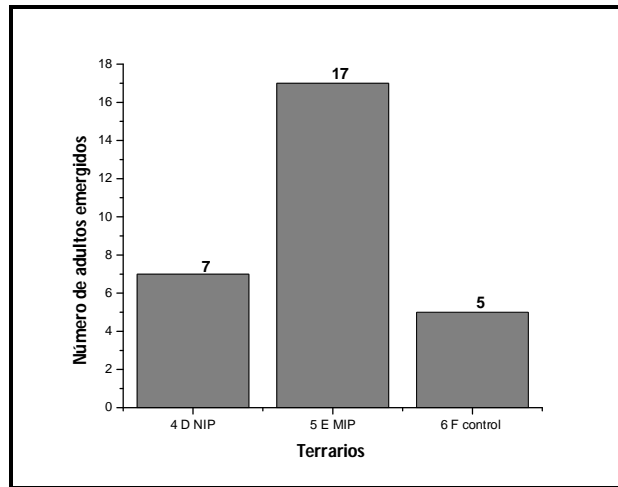
Los resultados obtenidos para las larvas en donde se evaluó el efecto de la interacción polímero-ivermectina (terrarios 1 A y 2 B) son similares a los de los terrarios 4 D y 5 E, lo que sugiere que el polímero impreso tanto como el no impreso lograron disminuir el efecto nocivo de la ivermectina sobre la población de larvas de escarabajo, incluso cuando el polímero dejó de ser administrado durante 11 días, esto resultados no se observaron en el caso de los escarabajos adultos en los terrarios 4 D y 5 E en donde se colocaron las muestras de los borregos a los que se le dejó de administrar el NIP-UV y MIP-IVM-UV respectivamente durante 11 días (los escarabajos y larvas se encontraban en el mismo terrario por lo tanto fueron expuestos a la misma cantidad de muestras) los cuales tuvieron el mismo comportamiento que el terrario control (6 F) que corresponde a la muestra del borrego tratado con ivermectina, por lo que se debe considerar otros factores los cuales pudieron afectar la supervivencia de los escarabajos (edad de los escarabajos).

➤ **Pupas que alcanzaron el estado adulto**

En la gráfica 13 se observa que en los tres terrarios 4 D, 5 E y 6 F, en los cuales se colocaron las muestras recolectadas a los 15 dpt y que además se les administro el NIP-UV (terrario 4 D), MIP-IVM-UV (terrario 5 E) y el borrego control (terrario 6 F). Se completó el ciclo donde las pupas llegan al estado adulto. Aunque se observa que existe un mayor número de adultos emergidos en el terrario 5 E en donde se colocaron las muestras de los borregos a los

## RESULTADOS

que se les administró el polímero impreso (MIP –IVM- UV), este resultado se puede deber a la disminución de la toxicidad de la ivermectina eliminada por las heces debida a la interacción del fármaco con el polímero. No obstante también se debe considerar que el estudio se hizo durante 22 días, por lo que es posible que las pupas llegaran el estado adulto después del día 22, en los otros dos casos.



Gráfica 13. Número de pupas que alcanzaron el estado adulto.



---

---

## 7. CONCLUSIONES

Se sintetizó el polímero de impresión para la molécula de ivermectina (MIP-IVM) y su respectivo polímero no impreso (NIP-UV) utilizando como monómero funcional el ácido metacrílico, el triacrilato de pentaeritrol como entrecruzador y utilizando como porógeno al cloroformo, la polimerización se realizó vía radicales libres.

La obtención del polímero libre de ivermectina, para poder ser utilizados como un sistema de recuperación de ivermectina *in vivo*, requirió de lavados sucesivos con etanol.

Los bolos mostraron ser un sistema eficaz para la administración del polímero (MIP-IVM—UV y NIP-UV) a los borregos previamente tratados con ivermectina, la adición del sabor manzana permitió la aceptación de los bolos por parte de los borregos.

Se recolectaron muestras de estiércol de cada uno de los grupos (control, prueba NIP y prueba MIP), con estas muestras se realizó el bioensayo con escarabajos de la especie *Scarabaeidae*; *Scarabaeinae*. En el terrario en donde se colocó la muestra del grupo de borregos a los que se les dio el polímero impreso fue donde hubo menos muerte de escarabajos como de larvas, el valor de TL50 en este terrario fue de 52.4 días para los escarabajos y el de larvas no fue posible determinarlo debido a que no hubo muerte de éstas en el periodo que duró el bioensayo. Comparado con el terrario donde se colocaron la muestra del grupo control en el cual se obtuvo un TL 50 para los escarabajos de 17 días y para las larvas 15.48 días. Lo que sugiere que la ivermectina fue atrapada por el polímero impreso en el tracto gastrointestinal del borrego y de esta manera la ivermectina fue eliminada por las heces, por lo tanto la ivermectina atrapada en el polímero es menos biodisponible cuando es ingerida por los escarabajos, lo que disminuye el efecto nocivo del fármaco de forma prácticamente completa.

El polímero no impreso presentó resultados interesantes, aunque este polímero no contiene sitios específicos que reconozcan a la ivermectina, si puede formar

interacciones con ésta, por lo que también se vio disminuido el efecto nocivo del fármaco sobre la población de escarabajos y larvas con valores de TL50 mayores que el del control, para los escarabajos de 37 días para la larvas no fue posible determinarlo ya que no hubo muerte.

La administración de polímero (NIP o MIP) disminuyó el efecto nocivo de la ivermectina sobre los ciclos de vida de escarabajo, completando de esta manera los ciclos de larvas mudando a pupas y pupas llegando a adultos. Con lo que se asegura la supervivencia de las próximas generaciones. Los mejores resultados se obtuvieron con el polímero impreso (MIP-IVM-UV) debido que este polímero posee sitios de reconocimientos específicos para la ivermectina.

En el bioensayo donde se colocaron las muestras obtenidas a los 15 días post-tratamiento con ivermectina, no existió diferencia en el caso de los escarabajos adultos, entre los que se expusieron a muestras de borregos que se les administró el polímero (MIP o NIP) o el que sólo fue tratado con ivermectina.

En el caso de las larvas si hubo una diferencia, larvas que fueron expuestas a las muestras de los borregos a los que se les administró el polímero no se vieron afectadas por la presencia de ivermectina en la heces como en el caso del larvas expuestas a las muestras del borrego que solo fue tratado con ivermectina. Por lo que es posible que una pequeña cantidad de polímero permaneciera en el tracto gastrointestinal de los borregos, disminuyendo de esta manera la concentración de ivermectina libre eliminada en las heces.

Los resultados obtenidos muestran que el polímero impreso de ivermectina es un sistema capaz de “atrapar” el fármaco en el sistema gastrointestinal de animales previamente tratados (con ivermectina), disminuyendo de esta forma el efecto nocivo de la ivermectina eliminada en las heces, sobre la fauna del suelo. El polímero impreso de ivermectina es capaz de permanecer en el tracto gastrointestinal, después de su administración, durante al menos once días por lo que el polímero presente en el tracto gastrointestinal continua atrapando a la ivermectina.

## 8. PERSPECTIVAS

- Los resultados obtenidos muestran que el polímero de impresión molecular de ivermectina disminuye el efecto nocivo de este fármaco sobre la fauna suelo, por lo que se deben realizar pruebas en tierras de pastoreo para considerar los factores ambientales que provocan la muerte de escarabajos.
- Realizar bioensayos en otros organismos, ejemplo: lombrices de tierra y peces.
- Los bolos fueron un buen vehículo para la administración del polímero, pero se debe evaluar la adición del polímero en un complemento alimenticio.
- Sintetizar polímero de impresión para fármacos que afecten al medio ambiente (antibióticos y antiparasitarios), cuando son eliminados principalmente por heces, y evaluar su uso como sistemas para disminuir el efecto nocivo de los fármacos.

---

**9. BIBLIOGRAFÍA**

1. Boxall, A. B. A.; Kolpin, D. W.; Halling-Sørensen, B.; Tolls, J., Are veterinary medicines causing environmental risks? *Environmental Science and Technology* **2003**, *37* (15).
2. Klaus, K., *Pharmaceuticals in the Environment Sources, Fate, Effects and Risks*. 3rd ed.; Springer Berlin Heidelberg: Germany, 2008.
3. Losey, J. E.; Vaughan, M., The economic value of ecological services provided by insects. *BioScience* **2006**, *56* (4), 311-323.
4. Wistuba, D.; Schurig, V., Enantiomer separation of chiral pharmaceuticals by capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A* **2000**, *875* (1-2), 255-276.
5. Aboul-Enein, H. Y.; Stefan, R. I., Enantioselective sensors and biosensors in the analysis of chiral drugs. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **1998**, *28* (3), 259-266.
6. Vlatakis, G.; Andersson, L. I.; Muller, R.; Mosbach, K., Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. *Nature* **1993**, *361* (6413), 645-647.
7. Cunliffe, D.; Kirby, A.; Alexander, C., Molecularly imprinted drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57* (12), 1836-1853.
8. Sellergren, B.; Allender, C. J., Molecularly imprinted polymers: A bridge to advanced drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57* (12), 1733-1741.
9. Huval, C. C.; Bailey, M. J.; Braunlin, W. H.; Randall Holmes-Farley, S.; Harry Mandeville, W.; Petersen, J. S.; Polomoscanik, S. C.; Sacchiro, R. J.; Chen, X.; Dhal, P. K., Novel cholesterol lowering polymeric drugs obtained by molecular imprinting [6]. *Macromolecules* **2001**, *34* (6), 1548-1550.
10. Huval, C. C.; Chen, X.; Holmes-Parley, S. R.; Mandeville, W. H.; Polomoscanik, S. C.; Sacchiro, R. J.; Dhal, P. K. In *Molecularly imprinted bile acid sequestrants: Synthesis and biological studies*, Boston, MA., Kofinas, P.; Sellergren, B.; Roberts, M. J., Eds. Boston, MA., 2003; pp 85-90.
11. Crane, M.; Boxall, A.; Barrett, K., *Veterinary medicines in the environment*. 1 ed.; CRC Press: 2008.
12. Adler, N. E.; Koschorreck, J.; Rechenberg, B., *Environmental impact assessment and control of pharmaceuticals: The role of environmental agencies*. IWA publishing: Germany, 2008; Vol. 57, p 91-97.
13. Aba, B.; Fogg, L. A., *Review of Veterinary Medicines in the Environment*. Bristol (UK): Environment Agency **2002**.
14. Directorate, V. M. SALES OF ANTIMICROBIAL PRODUCTS AUTHORISED FOR USE AS VETERINARY MEDICINES, ANTIPROTOZOALS, ANTIFUNGALS, AND COCCIDIOSTATS, IN THE UK IN 2009. <http://www.vmd.gov.uk/pdf/salesanti09.pdf> (accessed 14 de marzo 2011).
15. Boxall, A. B. A.; Fogg, L. A.; Blackwell, P. A.; Kay, P.; Pemberton, E. J.; Croxford, A., Veterinary medicines in the environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* **2004**, *180*, 1-91.
16. Montforts, M. H. M. M., *Environmental Risk Assessment for Veterinary Medicinal Products. Part 1: Other Than GMO-containing and Immunological Products*. Bilthoven (NL): RIVM **1999**.
17. Halley, B. A.; VandenHeuvel, W. J. A.; Wislocki, P. G., Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. *Veterinary Parasitology* **1993**, *48* (1-4), 109-125.
18. Liebig, M.; Fernandez, A. A.; Blübaum-Gronau, E.; Boxall, A.; Brinke, M.; Carbonell, G.; Egeler, H.; Fenner, K.; Fernandez, C.; Fink, G.; Garric, J.; Halling-Sørensen, B.; Knacker, T.; Krogh, K. A.; Küster, A.; Dirk, L.; Cots, M. A. P.; Pope, L.; Prasse, C.; Römbke, J.; Rönnefahrt, I.; Schneider, M. K.; Schweitzer, N.; Tarazona, J. V.; Ternes, T. A.; Traunsperger, W.; Wehrhan, A.; Duisy, K., Environmental risk assessment of ivermectin: A case study. *Integrated Environmental Assessment and Management* **2010**, *6* (SUPPL. 1), 567-587.

19. Āmura, S., Ivermectin: 25 years and still going strong. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2008**, *31* (2), 91-98.
20. Rohrer, S. P.; Evans, D. V., Binding characteristics of ivermectin in plasma from collie dogs. *Veterinary Research Communications* **1990**, *14* (2), 157-165.
21. Fernandez, C.; Andrés, M. S.; Porce, M. A.; Rodriguez, C.; Alonso, A.; Tarazona, J. V., Pharmacokinetic profile of Ivermectin in cattle dung excretion, and its associated environmental hazard. *Soil and Sediment Contamination* **2009**, *18* (5), 564-575.
22. Sumano-Lop ez, H. S., *Farmacolog a veterinaria* 3er ed.; McGraw-Hill Interamericana: México, 2006; p 452, 473-477.
23. Gonzalez Canga, A.; Sahagun, A.; Diez, M. J.; Fernandez, N.; Sierra, M.; Garcia, J. J., Bioavailability of a commercial formulation of ivermectin after subcutaneous administration to sheep. *American Journal of Veterinary Research* **2007**, *68* (1), 101-106.
24. Schoop, W.; Soll, M., Ivermectin, abamectin and eprinomectin. *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy* **2002**, 1-29.
25. Edwards, C. A.; Atiyeh, R. M.; Römbke, J., Environmental impact of avermectins. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **2001**, *171*, 111-137.
26. Blume, R. R.; Younger, R. L.; Aga, A.; Myers, C. J., Effects of residues of certain anthelmintics in bovine manure on *Onthophagus gazella*, a non-target organism. *Southwest. Entomol* **1976**, *1*, 100-103.
27. Hempel, H.; Scheffczyk, A.; Schallna , H. J.; Lumaret, J. P.; Alvinerie, M.; Römbke, J., Toxicity of four veterinary parasiticides on larvae of the dung beetle *Aphodius constans* in the laboratory. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2006**, *25* (12), 3155-3163.
28. Iglesias, L. E.; Saumell, C. A.; Fernández, A. S.; Fus , L. A.; Lifschitz, A. L.; Rodriguez, E. M.; Steffan, P. E.; Fiel, C. A., Environmental impact of ivermectin excreted by cattle treated in autumn on dung fauna and degradation of faeces on pasture. *Parasitology Research* **2006**, *100* (1), 93-102.
29. O'Hea, N. M.; Kirwan, L.; Giller, P. S.; Finn, J. A., Lethal and sub-lethal effects of ivermectin on north temperate dung beetles, *Aphodius ater* and *Aphodius rufipes* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect Conservation and Diversity* *3* (1), 24-33.
30. Fernandez, C.; Andrés, M. S.; Porce, M. A.; Rodriguez, C.; Alonso, A.; Tarazona, J. V., Pharmacokinetic profile of Ivermectin in cattle dung excretion, and its associated environmental hazard. *Soil and Sediment Contamination* **2009**, *18* (5), 564-575.
31. Sommer, C., Ivermectin excreted in cattle dung after subcutaneous injection or pour-on treatment: concentrations and impact on dung fauna. *Bulletin of Entomological Research* **1992**, *82* (2), 257-264.
32. Strong, L.; Wall, R.; Woolford, A.; Djeddour, D., The effect of faecally excreted ivermectin and fenbendazole on the insect colonisation of cattle dung following the oral administration of sustained-release boluses. *Veterinary Parasitology* **1996**, *62* (3-4), 253-266.
33. Floate, K. D.; Fox, A. S., Indirect effects of ivermectin residues across trophic levels: *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) and *Muscidifurax zaraptor* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Bulletin of Entomological Research* **1999**, *89* (3), 225-229.
34. Gover, J.; Strong, L., Determination of the toxicity of faeces of cattle treated with an ivermectin sustained-release bolus and preference trials using a dung fly, *Neomyia cornicina*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **1996**, *81* (2), 133-139.
35. Errouissi, F.; Alvinerie, M.; Galtier, P.; Kerb uf, D.; Lumaret, J. P., The negative effects of the residues of ivermectin in cattle dung using a sustained-release bolus on *Aphodius constans* (Duft.) (Coleoptera: Aphodiidae). *Veterinary Research* **2001**, *32* (5), 421-427.
36. Chapman, A.; Gray, J.; Taylor, K., Development of a Toxicity Test Method Using the Dung Beetle *Onthophagus Taurus*. **2003**, *60*, 14-16.
37. Lumaret, J. P.; Kadiri, N., The influence of the first wave of colonizing insects on cattle dung dispersal. *Pedobiologia* **1995**, *39* (6), 506-517.

38. McCracken, D. I., The potential for avermectins to affect wildlife. *Veterinary Parasitology* **1993**, *48* (1-4), 273-280.
39. Lobo, J. M., Decline of roller dung beetle (Scarabaeinae) populations in the Iberian peninsula during the 20th century. *Biological Conservation* **2001**, *97* (1), 43-50.
40. (a) Biström, O.; Silfverberg, H.; Rutanen, I., Abundance and distribution of coprophilous Histerini (Histeridae) and Onthophagus and Aphodius (Scarabaeidae) in Finland (Coleoptera). *Entomologica Fennica* **1991**, *2*, 53-66; (b) Gustavsson, G., Dyngbagger (Coleoptera: Scarabaeidae) på kustnara betesmarker i mellersta Halland. *Entomologisk Tidskrift* **1998**, *119*, 151-162.
41. Wall, R.; Strong, L., Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin. *Nature* **1987**, *327* (6121), 418-421.
42. Herd, R. P.; Sams, R. A.; Ashcraft, S. M., Persistence of ivermectin in plasma and faeces following treatment of cows with ivermectin sustained-release, pour-on or injectable formulations. *International Journal for Parasitology* **1996**, *26* (10), 1087-1093.
43. Floate, K. D., Off-target effects of ivermectin on insects and on dung degradation in southern Alberta, Canada. *Bulletin of Entomological Research* **1998**, *88* (1), 25-35.
44. (a) Hea, S. B.; Lee, J. H.; Oh, S. K.; Young, E. N.; Yong, S. J.; Won, H. K., Effects of paracoprid dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae) on the growth of pasture herbage and on the underlying soil. *Applied Soil Ecology* **2005**, *29* (2), 165-171; (b) Nichols, E.; Spector, S.; Louzada, J.; Larsen, T.; Amezcua, S.; Favila, M. E., Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles. *Biological Conservation* **2008**, *141* (6), 1461-1474.
45. González-Vainer, E. M. C. C., BIOLOGÍA Y ESTADOS INMADUROS DE ATAENIUS PERFORATUS HAROLD, 1867 (COLEOPTERA: SCARABAEIDAE: APHODIINAE). *m3m : Monografías Tercer Milenio* **2003**, *3*, 8.
46. Marcos, B. X. E. Aspectos Termodinámicos de la Química Supramolecular de la Vida. . UNAM, Mexico D.F., 2007.
47. fernandez, A.; guardia, L., Reconocimiento molecular mediante materiales biomiméticos: impresión molecular *anales de la real sociedad española de química* **2007**, *103* (2), 14-22.
48. Yan, M.; Ramström, O., *Molecularly Imprinted Materials: Science and Technology*. Marcel Dekker: New York, 2005.
49. Voet, D.; Voet, J. G., *Bioquímica*. Editorial médica panamericana: 2006.
50. Takeuchi, T.; Haginaka, J., Separation and sensing based on molecular recognition using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1999**, *728* (1), 1-20.
51. Alexander, C.; Andersson, H. S.; Andersson, L. I.; Ansell, R. J.; Kirsch, N.; Nicholls, I. A.; O'Mahony, J.; Whitcombe, M. J., Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003. *Journal of Molecular Recognition* **2006**, *19* (2), 106-180.
52. Pichon, V.; Chapuis-Hugon, F., Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants-A review. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *622* (1-2), 48-61.
53. Cormack, P. A. G.; Elorza, A. Z., Molecularly imprinted polymers: Synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2004**, *804* (1), 173-182.
54. Fernández-González, A.; Badía Laiño, R.; Díaz-García, M. E.; Guardia, L.; Viale, A., Assessment of molecularly imprinted sol-gel materials for selective room temperature phosphorescence recognition of nafcillin. *Journal of Chromatography B* **2004**, *804* (1), 247-254.
55. Greene, N. T.; Shimizu, K. D., Colorimetric molecularly imprinted polymer sensor array using dye displacement. *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127* (15), 5695-5700.

56. Chou, L. C. S.; Liu, C. C., Development of a molecular imprinting thick film electrochemical sensor for cholesterol detection. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2005**, *110* (2), 204-208.
57. Azodi-Deilami, S.; Abdouss, M.; Javanbakht, M., The Syntheses and Characterization of Molecularly Imprinted Polymers for the Controlled Release of Bromhexine. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2010**, 1-15.
58. Norell, M. C.; Andersson, H. S.; Nicholls, I. A., Theophylline molecularly imprinted polymer dissociation kinetics: A novel sustained release drug dosage mechanism. *Journal of Molecular Recognition* **1998**, *11* (1-6), 98-102.
59. Kryscio, D. R.; Peppas, N. A., Mimicking biological delivery through feedback-controlled drug release systems based on molecular imprinting. *AIChE Journal* **2009**, *55* (6), 1311-1324.
60. Wulff, G., Enzyme-like catalysis by molecularly imprinted polymers. *Chemical Reviews* **2002**, *102* (1), 1-27.
61. Tafoya, O. H. M., Síntesis y caracterización de polímeros de impresión molecular para liberación prolongada de Ivermectina UNAM, F. d. Q., Ed. Mexico, 2010.

**10. ANEXO 1**

Terrarios 1A, 2 B y 3C, escarabajos adultos.

Description	NL Fit
User Name	victor
Operation Time	02/05/2011 13:40
Model	Slogistic1
Equation	$y = a/(1 + \exp(-k*(x-xc)))$
Report Status	New Analysis Report
Multi-Data Fit Mode	Independent Fit - Consolidated Report

Parameters		Value	Standard Error
A nip 1:10	a	20.85688	0.83129
A nip 1:10	xc	38.03116	1.31439
A nip 1:10	k	-0.12693	0.02601
B mip 1:10	a	25.05271	0.05148
B mip 1:10	xc	49.46594	0.93784
B mip 1:10	k	-0.23196	0.02476
C control	a	25.54219	3.03225
C control	xc	17.44201	1.76572
C control	k	-0.2899	0.11654

statistics	A nip 1:10	B mip 1:10	C control
Number of Points	11	11	11
Degrees of Freedom	8	8	8
Reduced Chi-Sqr	1.43633	0.01546	15.34603
Residual Sum of Squares	11.49067	0.12367	122.76821
Adj. R-Square	0.91183	0.98191	0.87961
Fit Status	Succeeded(100)	Succeeded(100)	Succeeded(100)

summary	a	a	xc	xc	k	k	Statistics	Statistics
	Value	Error	Value	Error	Value	Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square
A nip 1:10	20.85688	0.83129	38.03116	1.31439	-0.12693	0.02601	1.43633	0.91183
B mip 1:10	25.05271	0.05148	49.46594	0.93784	-0.23196	0.02476	0.01546	0.98191
C control	25.54219	3.03225	17.44201	1.76572	-0.2899	0.11654	15.34603	0.87961



ANEXO 1

ANOVA		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
A nip 1:10	Regression	3	3364.50933	1121.50311	780.80959	6.75E-10
A nip 1:10	Residual	8	11.49067	1.43633		
A nip 1:10	Uncorrected Total	11	3376			
A nip 1:10	Corrected Total	10	162.90909			
B mip 1:10	Regression	3	6684.87633	2228.29211	144147.202	0
B mip 1:10	Residual	8	0.12367	0.01546		
B mip 1:10	Uncorrected Total	11	6685			
B mip 1:10	Corrected Total	10	8.54545			
C control	Regression	3	2135.23179	711.74393	46.37969	3.97E-05
C control	Residual	8	122.76821	15.34603		
C control	Uncorrected Total	11	2258			
C control	Corrected Total	10	1274.72727			

Terrario 4D, 5E y 6F, escarabajos adultos

Description	NL Fit
User Name	adriana
Operation Time	03/05/2011 21:31
Model	Logistic
Equation	$y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$
Report Status	New Analysis Report
Multi-Data Fit Mode	Independent Fit - Consolidated Report

Parameters		Value	Standard Error
4 D nip 1:10	A1	28.87714	3.78411
4 D nip 1:10	A2	-728772.268	7.04E+10
4 D nip 1:10	x0	21318.91054	1.35E+09
4 D nip 1:10	p	1.52218	2.69719
5 E mip 1:10	A1	20	0.66667
5 E mip 1:10	A2	8.33333	0.54433
5 E mip 1:10	x0	6.91374	614.39855
5 E mip 1:10	p	98.10368	703126.783
6 F control	A1	18.00001	0.33333
6 F control	A2	0.33333	0.27217
6 F control	x0	6.96025	44.64722
6 F control	p	87.93531	99048.07786

Statistics	4 D nip 1:10	5 E mip 1:10	6 F control
Number of Points	7	7	7
Degrees of Freedom	3	3	3

ANEXO 1

Reduced Chi-Sqr	16.60112	0.88889	0.22222
Residual Sum of Squares	49.80335	2.66667	0.66667
Adj. R-Square	0.73347	0.97524	0.99718
Fit Status	Failed(-203)	Succeeded(100)	Succeeded(100)

Summary	A1	A1	A2	A2	x0	x0	p	p	Statistics	Statistics
	Value	Error	Value	Error	Value	Error	Value	Error	Reduced Chi-Sqr	Adj. R-Square
4 D nip 1:10	28.877	3.784	-728772.3	7.04E+10	21318.91	1.35E+09	1.522	2.697	16.60	0.733
5 E mip 1:10	20	0.666	8.333	0.544	6.91374	614.399	98.103	703126.8	0.888	0.975
6 F control	18.00	0.333	0.333	0.272	6.96025	44.6472	87.935	99048.08	0.222	0.997

ANOVA		DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Prob>F
4 D nip 1:10	Regression	4	3845.19665	961.29916	57.90569	0.00374
4 D nip 1:10	Residual	3	49.80335	16.60112		
4 D nip 1:10	Uncorrected Total	7	3895			
4 D nip 1:10	Corrected Total	6	373.71429			
5 E mip 1:10	Regression	4	1529.33333	382.33333	430.125	1.90E-04
5 E mip 1:10	Residual	3	2.66667	0.88889		
5 E mip 1:10	Uncorrected Total	7	1532			
5 E mip 1:10	Corrected Total	6	215.42857			
6 F control	Regression	4	1021.33333	255.33333	1149	4.35E-05
6 F control	Residual	3	0.66667	0.22222		
6 F control	Uncorrected Total	7	1022			
6 F control	Corrected Total	6	472.85714			