

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Diseño, desarrollo y validación de un método analítico para la
identificación y cuantificación de ivermectina en músculo
bovino

Trabajo de graduación presentado por Jenifer Andrea Padilla Revolorio para optar al
grado académico de Licenciada en Química Farmacéutica

Guatemala

2017

Diseño, desarrollo y validación de un método analítico para la
identificación y cuantificación de ivermectina en músculo
bovino

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades



Diseño, desarrollo y validación de un método analítico para la identificación y cuantificación de ivermectina en músculo bovino

Trabajo de graduación presentado por Jenifer Andrea Padilla Revolorio para optar al grado académico de Licenciada en Química Farmacéutica

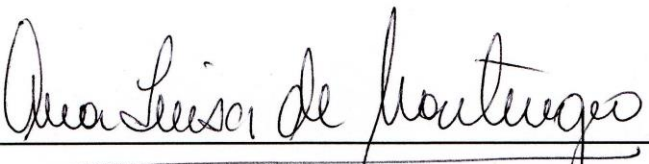
Guatemala


2017

Vo. Bo. :

(f) 
Licenciada Ana Luisa Mendizabal Solé de Montenegro
Asesor

Tribunal Examinador:

(f) 
Licenciada Ana Luisa Mendizabal Solé de Montenegro
Asesor

(f) 
Dr. Herber Ronaldo Morales Estevéz

(f) 
Dr. Elfege Rolando López García

Fecha de aprobación: Guatemala, 27 de febrero de 2017

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS.....	vi
LISTA DE GRÁFICOS	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO CONCEPTUAL	2
A. Antecedentes	2
B. Justificación.....	5
C. Planteamiento del problema	6
D. Alcances y límites	6
III. MARCO TEÓRICO.....	7
A. Ivermectina especificaciones	7
1. Estructura química	7
2. Sinónimos	7
3. Nombre comercial.....	7
4. Composición	8
5. Apariencia.....	9
6. Solubilidad	9
7. Rotación específica	9
8. Contenido de agua.....	9
9. Residuo de ignición.....	9
10. Metales pesados	9
11. Sustancias relacionadas.....	10
12. Impurezas con una retención relativa de 1.3 a 1.5.....	10

13. Otras impurezas	10
14. Relación estructura actividad	10
B. Uso en el ganado	10
1. Vías de administración.....	10
2. Dosis	10
3. Espectro de actividad	11
4. Efectos secundarios.....	11
5. Relación costo-beneficio.....	11
6. Farmacodinamia.....	11
7. Farmacocinética	12
C. Uso en humanos	14
1. Dosis y vía de administración	14
2. Usos.....	14
3. Estimación de Exposición Alimentaria Crónica (GECDE).....	15
4. Estimación de Exposición Alimentaria Aguda (GEADE).....	15
5. Límites máximos de residuos (LMR)	15
6. Ingesta Diaria Admisible (IDA).....	15
7. Efectos secundarios.....	15
8. Contraindicaciones.....	16
9. Toxicología	16
D. Derivatización	17
E. Método de cuantificación de ivermectina en músculo bovino	20
1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	20
a. Fundamentos y principios básicos	20
b. Instrumentación.....	20

1)	Fase móvil y sistemas de tratamiento de disolventes	21
2)	Sistema de bombeo	22
3)	Sistema de inyección de muestra.....	23
4)	Columna.....	24
5)	Detector de fluorescencia	24
a)	Detección de luminiscencia	24
b)	Efecto Raman	26
F.	Validación de metodologías analíticas	27
1.	Parámetros de validación	27
a.	Exactitud/Veracidad.....	27
b.	Precisión.....	27
c.	Especificidad/Selectividad	27
d.	Intervalo	28
e.	Límite de cuantificación.....	28
f.	Límite de detección	28
g.	Linealidad	28
IV.	MARCO METODOLÓGICO.....	29
A.	Objetivos	29
1.	Objetivo general	29
2.	Objetivos específicos	29
B.	Población.....	29
C.	Muestra.....	29
D.	Procedimiento	30
1.	Instalaciones.....	30
2.	Procedimiento	30

a.	Preparación de la solución madre de ivermectina.....	30
b.	Preparación de la solución de ivermectina.....	30
c.	Preparación de la solución 1-metilimidazol/acetonitrilo.....	30
d.	Preparación de la solución anhídrido trifluoroacético/acetonitrilo.....	30
e.	Preparación de la curva de calibración.....	31
3.	Validación del método de cuantificación.....	31
a.	Exactitud	31
b.	Precisión.....	31
c.	Linealidad.....	32
d.	Especificidad/selectividad.....	32
E.	Equipo.....	32
F.	Diseño de investigación.....	33
G.	Análisis estadístico	33
V.	MARCO OPERATIVO	34
A.	Recabación y tratamiento de datos.....	34
B.	Recursos	34
1.	Recurso humano.....	34
2.	Recurso material	34
a.	Documentos.....	34
b.	Suministros	35
c.	Reactivos.....	35
d.	Equipo.....	35
e.	Cristalería	36
VI.	RESULTADOS.....	37
VII.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	42

A.	Metodología y equipo	42
B.	Curva en partes por millón	43
C.	Curva en partes por billón	44
D.	Blanco	45
E.	Límite de detección y límite de cuantificación	45
F.	Muestra	45
VIII.	CONCLUSIONES	47
IX.	RECOMENDACIONES	48
X.	BIBLIOGRAFÍA	50
XI.	ANEXOS	56
A.	Procedimiento para el lavado de cristalería	56
B.	Cromatogramas en dos dimensiones	57
C.	Cromatogramas en tres dimensiones	62
D.	GLOSARIO	67

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Composición química de ivermectina.....	8
2. Condiciones del cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de fluorescencia	32
3. Linealidad de la curva en ppm.....	37
4. Repetibilidad y linealidad de la curva en ppb.....	39
5. Rango teórico.....	40
6. Blanco	40
7. Límites de detección y cuantificación.....	41

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico	Página
1. Estructura química de la ivermectina.....	7
2. Estructura química de la avermectina B _{1a}	8
3. Estructura química de la avermectina B _{1b}	9
4. Farmacocinética de la ivermectina.....	13
5. Derivatización de la ivermectina	17
6. Estabilidad de la ivermectina y abamectina derivatizada en exposición o protegido de la luz a temperatura ambiente	18
7. Estabilidad de la ivermectina y abamectina derivatizada a diferente temperatura	19
8. Diagrama básico de los componentes de un aparato de HPLC	21
9. Ejemplificación gráfica de la elución con gradiente e isocrática.....	23
10. Absorción y emisión de luz.....	25
11. Efecto Raman.....	26
12. Gráfico de la curva de calibración en ppm	38

RESUMEN

La validación de una metodología analítica consiste en un procedimiento para implantar de manera documentada, pruebas que demuestren científicamente que el método analítico cumple las características de desempeño requeridas para determinar los parámetros de las aplicaciones analíticas. Involucra la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad, el error sistemático y al azar del procedimiento, no solo dentro de la calibración sino también, en el análisis de muestras reales (RTCA:2006).

El trabajo que se presenta a continuación se desarrolló con el propósito de diseñar, desarrollar, validar y estandarizar, dentro del laboratorio de Inocuidad de Alimentos del Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación (MAGA), un método analítico para la identificación y cuantificación de ivermectina, a nivel de trazas, en músculo bovino utilizando cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia.

Luego del trabajo analítico desarrollado, con el equipo, materiales y reactivos proporcionados no fue posible cumplir con el objetivo primordial de este trabajo de investigación que es diseñar un método analítico que proporcione resultados reproducibles, lineales y con un nivel apropiado de incertidumbre necesarios para la validación, con las condiciones tanto de reactivos como de equipo con que se cuenta en dicho laboratorio, ya que no se cumplió con los requerimientos solicitados para el desarrollo de este trabajo.

Los resultados obtenidos constituyen la fase inicial para el montaje del método, por si en un futuro cuando se cuente con las condiciones y recursos apropiados el método pueda ser validado.

I. INTRODUCCIÓN

La ivermectina es la primera avermectina/milbemicina creada para uso en animales, es un fármaco utilizado como antihelmíntico y actualmente se utiliza también en humanos para tratar Oncocercosis, una enfermedad presente en más de 20 millones de personas, causada por *Onchocerca volvulus* (Vercruysse y Rew, 2002:5).

Es muy utilizado en la actualidad por su amplio espectro de actividad, ya que es eficaz contra ectoparásitos-ácaros: *Sarcoptes scabiei* var. *bovis* y *Psoroptes ovis*; garrapatas: *Boophilus microplus*, *Boophilus decoloratus*; piojos: *Haematopinus eurysternus*, *Linognathus vituli*, *Solenopotes capillatus*; gusano barrenador: *Chrysomya bezziana* y larvas: *Hypoderma bovis*, *Dermatobia hominis* y *Hypoderma lineatum*. Además, no presenta tantos efectos secundarios como otros antiparasitarios (Godfrey, 1994:230).

El antihelmíntico es una mezcla de no menos de 90.0% de avermectina A_{1a}, 5-O-dimetil-22,23-dihidro-(componente H₂B_{1a}) y avermectina A_{1b}, 5-O-dimetil-25-di(1-metilpropil)-22,23-dihidro-25-(1-metiletil)-(componente H₂B_{1b}) (USP, 2005).

El objetivo de este trabajo de investigación fue desarrollar una metodología analítica para la identificación y cuantificación de ivermectina en músculo bovino, mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FLD, por sus siglas en inglés). Su importancia también radica en que actualmente no hay un método oficial en el país con el cual se pueda evaluar el contenido de ivermectina que contiene el músculo bovino para consumo humano y que pueda ser utilizado para permitir la exportación del mismo.

II. MARCO CONCEPTUAL

A. Antecedentes

Ivermectina es la primera avermectina/milbemicina creada para uso en animales, biológicamente, tiene un excelente potencial y un amplio espectro que incluye parásitos nematodos y ectoparásitos. Es eficaz como margen de seguridad y su mecanismo de acción produce una contribución significativa respecto a la medicina antiparasitaria. Igualmente, su descubrimiento facilitó la formulación de una variedad de formas farmacéuticas para ganado, ovejas, caballos, camellos, gatos, perros, cabras, cerdos, bisontes, renos y humanos, convirtiéndolo en el antiparasitario de mayor venta en el mundo (Vercruysse y Rew, 2002:5).

Actualmente, para ganado bovino se comercializa en una dosis de 200 µg/kg en un vehículo de propilenglicol/glicerol (60:40) por vía subcutánea. El fármaco proporciona altos niveles de eficacia contra nematodos (*Thelazia* y *Parafilaria*), artrópodos parasitarios comprendiendo larvas (*Hypoderma bovis*, *Hypoderma lineatum*, *Dermatobia hominis*), piojos chupadores (*Haematopinus eurysternus*, *Linognathus vituli*, *Solenopotes capillatus*), ácaros de la sarna (*Sarcoptes scabiei*, *Psoroptes ovis*) y gusano barrenador (*Chrysomya bezziana*) (Vercruysse y Rew, 2002:6). Igualmente, se puede administrar por vía oral pero no es tan efectivo para ectoparásitos (Godfrey, 1994:230).

Una dosis de 200 µg/kg de ivermectina por vía subcutánea es eficaz por 28 días contra reinfección con *Dictyocaulus viviparus* y *Oesophagostomum radiatum*, protege por 21 días contra *Ostertagia ostertagi*, *Trichostrongylus axei* y *Cooperia punctata* y brinda protección por 14 días contra *Haemonchus placei* y *Cooperia oncophora* (FDA, 2010).

Por otro lado, una dosis de 8 mg/kg puede provocar en la animal ataxia, depresión, aumento de la frecuencia respiratoria, fasciculaciones musculares, midriasis, rigidez extensa de los miembros y recaída en el animal a las 24 horas después de haber administrado la dosis (Campbell, 2012:151).

Cabe destacar que es considerado un fármaco económico debido a que la cantidad necesaria para que cumpla su efecto es 100 veces menor en comparación con otros productos, además, es altamente lipofílico y se conserva en el animal inhibiendo la reinfección por periodos de tiempo prolongados (Vercruysse y Rew, 2002: xiii).

A continuación, se listan algunos de los estudios realizados anteriormente para la identificación de ivermectina en músculo bovino:

- El estudio *High Performance Liquid Chromatographic determination of Avermectins in kidney, liver, muscle and fat with FLD* realizado por el Instituto Veterinario Onderstepoort en el 2013 muestra un método en el que se determinó la cantidad de ivermectina, abamectina, doramectina y moxidectin en 5 gramos de riñón, hígado, musculo y tejido adiposo utilizando HPLC-FLD con un límite de detección de 5 ppb en músculo y 10 ppb en riñón e hígado. La cantidad de ivermectina en hígado bovino fue de 0.100 ppm y en tejido adiposo fue de 0.040 ppm.
- El estudio *Determination of Ivermectin in Medicated Feeds by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection* realizado por Konrad Pietruk y Piotr Jedziniak en el 2013 muestra un método en el que se cuantifica la concentración de ivermectina en cuatro muestras de 5 gramos de alimento molido a base de animales medicados con ivermectina. Para realizarlo se utilizó HPLC-FLD con una linealidad de 0.4 – 4.0 µg/ml. Finalmente el coeficiente de variación calculado fue de 4.8%.

- El estudio *A Multiresidue Method for the Determination of Abamectin, Doramectin, Moxidectin, Ivermectin, Milbemectin A₃, and Milbemectin A₄ Residues in Bovine Muscle Using HPLC with Fluorescence Detection* realizado por Hsiu-Kuan Chou, *et al.* en el 2003 muestra un método en el que se determinó la concentración de cuatro Avermectinas incluyendo ivermectina en 50 muestras congeladas de 1 gramo de musculo bovino. El análisis se llevó a cabo en HPLC-FLD; como resultado, se obtuvo un límite de detección de 5 ppb con una desviación estándar relativa de 2.11 a 16.57.
- El estudio *Simultaneous Determination of Residual Antiparasitic Lactones in Bovine Muscle and Liver by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection* realizado por Tomoko Nagata, *et al.* en el 2003 muestra un método en el que se cuantificó la cantidad de lactonas macrolíticas, (incluyendo ivermectina) en musculo e hígado bovino, utilizando un HPLC-FLD. En efecto, los límites de cuantificación fueron 5 ppb para cada antibiótico.

A pesar de que en ninguno de los estudios mostrados anteriormente proponen un método para determinación únicamente de ivermectina, se puede observar que la cuantificación de la misma se realizó por medio de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución con detector de Fluorescencia. Por otro lado, los resultados que se obtuvieron en los estudios brindan seguridad de la detección en músculo bovino.

B. Justificación

La dosis de ivermectina recomendada para bovino es de 0.2 mg/kg por vía subcutánea y 0.5 mg/kg por vía percutánea como dosis única, siendo la vida media de cuatro días. Estudios muestran que el metabolismo en el ganado es 4 o 5 veces más lento en comparación con las ovejas y las ratas, siendo el 24-hidroximetil-H₂B_{1a} el metabolito hepático en mayor concentración (EMA, 1996); de manera que las concentraciones plasmáticas del fármaco o los metabolitos pueden ser determinados hasta 3 semanas después de haber comenzado la dosis.

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) realizó un estudio en donde calculó el porcentaje del residuo H₂B_{1a} en el ganado 28 días después de haber iniciado el tratamiento percutáneo con una dosis de 0.2 mg/kg y se hizo evidente que la distribución de los residuos en el músculo fue del 67%, seguido por el hígado (37%), el riñón (54%) y el tejido graso (18%) (EMEA, 1996). Por esta razón, se optó por el músculo bovino como mejor opción para determinar si la concentración de ivermectina administrada es la adecuada.

Es importante que haya un método oficial en el país con el cual se controle la concentración de ivermectina que contiene el músculo bovino, ya que, si las concentraciones son mayores a las establecidas, estaría ingresando al organismo de los consumidores cantidades del fármaco que pueden llegar a ser tóxicas a largo plazo, más aún, si son niños o personas hipersensibles al fármaco.

Actualmente, en Guatemala no existe un método oficial para la determinación de ivermectina en músculo bovino. Por esta razón, se buscó diseñar, desarrollar y validar una metodología analítica, para verificar la concentración de ivermectina en músculo bovino de exportación e importación, con el fin de que pudiera ser implementada y utilizada para evidenciar que la concentración del fármaco se encuentra dentro del rango permisible de aceptación y así brindar seguridad a los consumidores dentro y fuera del país.

C. Planteamiento del problema

¿Mediante la cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia, es viable diseñar un método analítico que permita obtener resultados reproducibles con un nivel apropiado de incertidumbre en cuanto a la determinación de la cantidad de ivermectina que se encuentra en el músculo bovino?

D. Alcances y límites

El alcance del estudio fue investigar los parámetros esenciales para la validación de un método analítico que permitiera la identificación y cuantificación de ivermectina en músculo bovino, utilizando el cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de Fluorescencia del Laboratorio de Inocuidad de Alimentos.

Entre los límites del estudio están que el método se desarrolló bajo las condiciones del cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de fluorescencia del Laboratorio de Inocuidad de Alimentos. Además, se circunscribió a reactivos y estándares proporcionados por ellos.

Asimismo, se trabajó bajo las condiciones ambientales en las que se encuentra el laboratorio, es decir, temperatura, humedad, ventilación, iluminación y ruido.

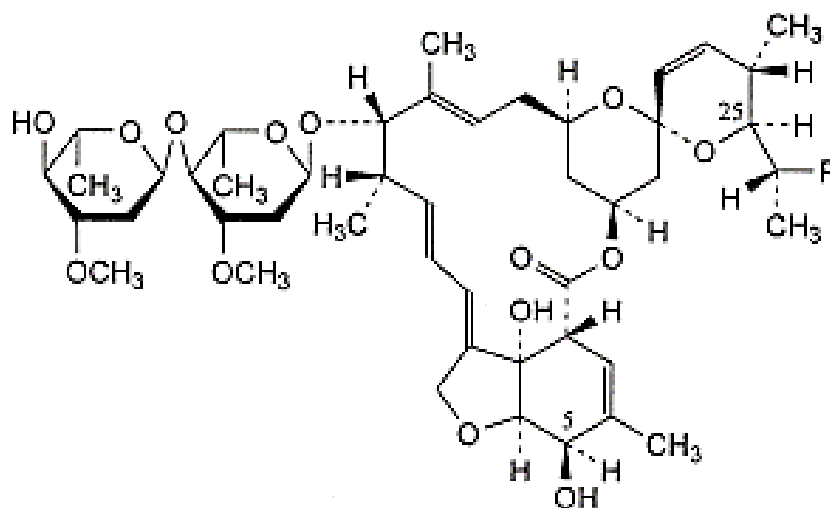
4. Composición. Es una mezcla de no menos de 90.0% de avermectina A_{1a}, 5-O-dimetil-22,23-dihidro-(componente H₂B_{1a}) y avermectina A_{1b}, 5-O-dimetil-25-di(1-metilpropil)-22,23-dihidro-25-(1-metiletil)-(componente H₂B_{1b}). La suma del componente H₂B_{1a} más el componente H₂B_{1b} no es menor del 95.0% y no más del 102.0%, calculado anhidro, alcohol y base libre de formamida. Es posible que contenga cantidades mínimas de antioxidantes y agentes quelantes (USP, 2005).

Cuadro No.1: Composición química de ivermectina

Componente	R	Fórmula molecular	Peso molecular
H ₂ B _{1a}	CH ₂ -CH ₃	C ₄₈ H ₇₄ O ₁₄	875
H ₂ B _{1b}	CH ₃	C ₄₇ H ₇₂ O ₁₄	861

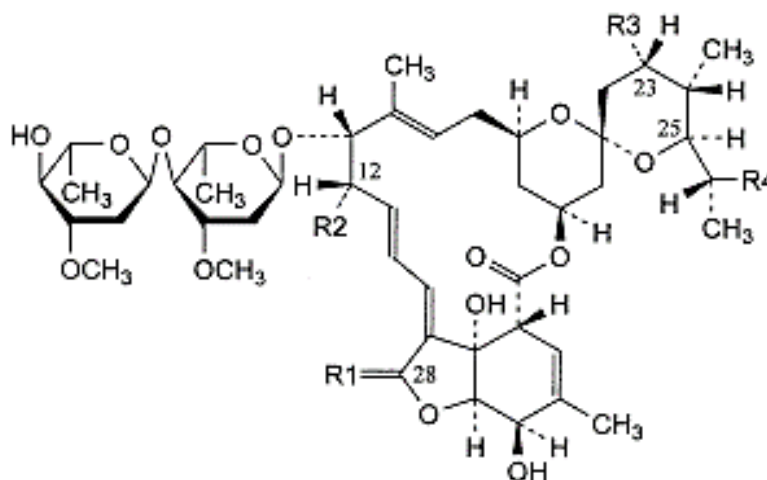
(BP, 2013)

Figura No.2: Estructura química de la avermectina B_{1a}



(BP, 2013)

Figura No.3: Estructura química de la avermectina B_{1b}



(BP, 2013)

5. Apariencia. Polvo cristalino de color blanco o amarillento, ligeramente higroscópico (BP, 2013).

6. Solubilidad. Insoluble en agua, libremente soluble en cloruro de metileno y soluble en alcohol (BP, 2013). La solubilidad en acetonitrilo es de 40 mg/mL a temperatura ambiente (Florey, 1988).

7. Rotación específica. Entre 17° y 20°, calculado en agua, alcohol y base libre de formamida (USP, 2005).

8. Contenido de agua. No más del 1.0% (USP, 2005).

9. Residuo de ignición. No más del 1.0% (USP, 2005).

10. Metales pesados. No más del 0.002% (USP, 2005).

11. Sustancias relacionadas. No más del 5.0% (BP, 2013).

12. Impurezas con una retención relativa de 1.3 a 1.5 (picos principales). No más del 2.5% (BP, 2013).

13. Otras impurezas. No más del 1.0% (BP, 2013).

14. Relación estructura actividad. El efecto antihelmíntico se debe al butil en el carbono 25, al doble enlace del carbono 22 y al doble enlace entre el carbono tres y cuatro (Godfrey, 1994:224).

B. Uso en el ganado

1. Vías de administración. El fármaco se puede administrar por vía oral, subcutánea, intramuscular y tópica. La administración oral se realiza mediante una solución o pasta, abarcando un espectro de actividad en nematodos gastrointestinales y pulmonares, pero no tan efectivo en ectoparásitos. Por otro lado, la fórmula tópica está compuesta de 0.5% peso/volumen de ivermectina y es efectiva para nematodos gastrointestinales, pulmonares y ectoparásitos (Godfrey, 1994:229).

2. Dosis. La dosis establecida es de 0.2 mg/kg del peso corporal vía subcutánea. Sin embargo, se ha administrado por vía oral hasta 8 mg/día, que es equivalente a 0.04 mg/kg/día (Godfrey, 1994:229). La dosis por vía oral es de 0.5 mg/kg (Canga *et al.*, 2009).

3. Espectro de actividad. Ivermectina es un antiparasitario excelente contra ectoparásitos-ácaros: *S. scabiei* var. *bovis* y *P. ovis*; garrapatas: *Boophilus microplus*, *B. decoloratus*; piojos: *H. eurytarnus*, *L. vituli*, *S. capillatus*; gusano barrenador: *C. bezziana* y larvas: *H. bovis*, *D. hominis* y *H. lineatum*. Igualmente, se ha observado que es muy eficaz en parásitos que se encuentran en los ojos de los animales, como *Thelazia rhodesii* (Godfrey, 1994:229). Además, se encuentra en otros nematodos como *Parafilaria*, *D. viviparus*, *O. radiatum*, *O. ostertagi*, *T. axei*, *C. punctata*, *H. placei* y *C. oncophora* (FDA, 2010).

4. Efectos secundarios. Se ha observado que el fármaco puede provocar esofagitis, edema y ataxia, acompañado de reacciones inflamatorias alérgicas ante las larvas muertas de *H. lineatum* (Godfrey, 1994:231). Rara vez se han presentado signos de toxicosis como midriasis, depresión y muerte (Canga, 2009).

5. Relación costo-beneficio. El éxito de ivermectina ha consistido en su efectividad en cuanto a la relación costo-beneficio, ya que se ha observado que, al utilizar el fármaco como tratamiento, el ganado tiende a ganar peso, aproximadamente 0.08 kg/día (equivalente a 0.23 kg menos de alimento/kg), además, debido a la duración del efecto del fármaco y a los pocos efectos secundarios ha sido económicamente beneficioso (Godfrey, 1994:231).

6. Farmacodinamia. El mecanismo de acción de ivermectina se debe a que actúa como agonista en los neurotransmisores del ácido gamma aminobutírico (GABA, por sus siglas en inglés) en las células nerviosas. El fármaco se enlaza a los canales de cloruro regulado por glutamato en los nervios y músculos de los invertebrados, de esta manera, inhibe la transmisión de las señales neuronales de los parásitos y en consecuencia paraliza el cuerpo del mismo. Finalmente, detiene la reproducción de los parásitos mediante la disminución de la oviposición u ocasionando una ovogénesis anormal (Junquera, 2016).

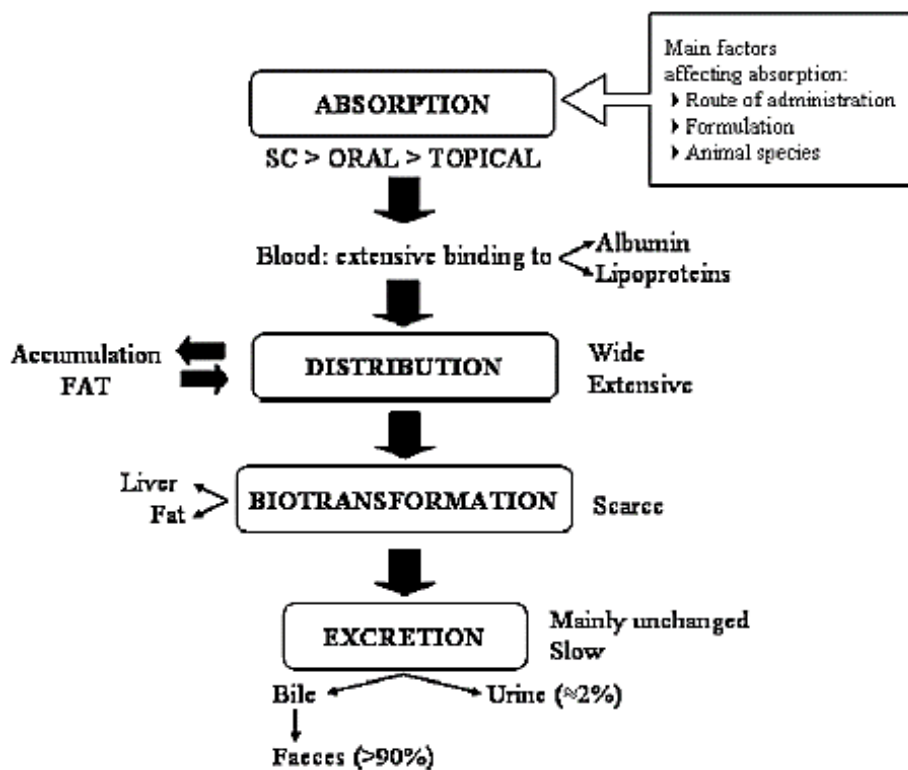
7. Farmacocinética. Los parámetros farmacocinéticos varían de acuerdo a factores como la especie, la vía de administración, el vehículo en la formulación, la concentración, peso corporal, condición física y el tipo de nutrición del animal. El mejor porcentaje de biodisponibilidad se obtiene por vía subcutánea y oral, por el contrario, el menor valor es obtenido por vía tópica, a pesar de que se administra una dosis mayor (0.5 mg/kg). La semivida del fármaco por vía subcutánea es de 8 días y el aclaramiento de 0.35 L/Kg día aunque varía de acuerdo a la fórmula farmacéutica (Canga *et al.*, 2009).

Por vía parenteral se obtiene una mayor concentración disponible en el plasma, una duración prolongada en cuanto a su acción y mejor eficacia, sin embargo, la absorción es más lenta en comparación con la vía oral, ya que al ser administrada oralmente es influenciada por la P-glicoproteína presente en el epitelio intestinal. Por otro lado, si se administra por vía subcutánea la absorción es prolongada ya que el fármaco al ser liposoluble precipita en el torrente sanguíneo y se absorbe lentamente (Canga *et al.*, 2009).

Por vía subcutánea ivermectina tiene una ventana terapéutica de aproximadamente 10 días y es efectiva contra *D. viviparus* por 21 días. Para ganado se requiere 0.5-1 ng/mL para obtener una actividad antihelmíntica óptima contra nematodos del pulmón y gastrointestinales. Las formulaciones tópicas son más efectivas para parásitos sensible como *D. viviparus* y *O. radiatum*, por otro lado, las formulas subcutáneas son menos sensibles a nematodos como *N. helvetianus* y *T. colubriformis* (Canga *et al.*, 2009).

La biodisponibilidad en el plasma varía según el vehículo de la forma farmacéutica. Cuando el vehículo contiene propilenglicol y glicerol 60:40 (v/v) la absorción no es tan buena y es lenta, de manera que es más favorable un vehículo acuoso, ya que este por ser hidrofílico tendrá una mejor absorción, la misma será más rápida, el tiempo de vida será prolongado y por ende la eficacia (Canga *et al.*, 2009).

Figura No.4: Farmacocinética de la ivermectina



(Canga *et al.*, 2009)

El fármaco tiene un amplio volumen de distribución y un aclaramiento lento debido a que es altamente lipofílico, en consecuencia, se acumula formando reservorios en el tejido graso, en el tejido cerebral y en el hígado. Por esta razón, perdura en el cuerpo por un largo periodo de tiempo, sin embargo, el volumen de distribución en ganado es menor en comparación con otros animales (Canga *et al.*, 2009).

La ivermectina se metaboliza por el hígado generando metabolitos, siendo el 24-OH-H2B1b el metabolito en mayor proporción para el ganado. Los metabolitos apolares se esterifican con los ácidos grasos acumulándose en el tejido graso y pueden ser detectados hasta 28 días después de la primera dosis (Canga *et al.*, 2009).

Por consiguiente, se excreta el 90% en heces (debido a que la P-glicoproteína se encuentra en los canales biliares) y menos del 2% en la orina, siendo la principal vía de excreción la bilis. Igualmente, es excretada en las glándulas mamarias de las vacas, las ovejas y las cabras. Si bien, la eliminación también se modifica en base a la nutrición, sexo, edad y condición física (Canga *et al.*, 2009).

C. Uso en humanos

1. Dosis y vía de administración. Según estudios, se ha observado que la mejor opción son dos dosis de 0.15 mg/kg administradas cada seis meses, ya que se presenta una menor cantidad de efectos secundarios (Godfrey, 1994:241).

2. Usos. Actualmente, el fármaco es utilizado para tratar Oncocercosis, una enfermedad presente en más de 20 millones de personas, causada por *Onchocerca volvulus*, cuyo vector es un insecto de la especie *Simulium ochraceum* para Centroamérica (Godfrey, 1994:239).

Dentro del insecto crece una larva que se convierte en un gusano adulto después de 1 año y permanece en la piel de la persona por muchos años, produciendo con el tiempo millones de microfilarias. Los síntomas de los pacientes con esta enfermedad son dermatitis debilitante y queratitis esclerosante, que eventualmente causa ceguera (Godfrey, 1994:239).

Igualmente, se ha usado en enfermedades de los ganglios linfáticos, en donde se observó que el tratamiento constante en intervalos cortos no mataba a los gusanos adultos. A pesar de que el tratamiento tiene un buen efecto no garantiza la muerte de gusanos adultos, aunque se administre una dosis más alta (Godfrey, 1994:241).

3. Estimación de Exposición Alimentaria Crónica (GECDE). La ingesta diaria estimada (IDE) es de 38 μg /persona de 60 kg, esto representa el 6% del límite superior del índice diario alimenticio (IDA). La GECDE para la población es de 0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por día, esto es equivalente al 9% del límite superior de la IDA. Asimismo, para niños el GECDE es de 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por día (15% del límite superior de la IDA) y de lactantes es de 1.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por día, representando el 13% del límite superior de la IDA (FAO/OMS, 2016).

4. Estimación de Exposición Alimentaria Aguda (GEADE). Estudios revelaron que después de 14 días se encontraron valores máximos de residuos en los sitios de inyección, a partir de esto se determinó que la GEADE es de 52 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal para la población en general y de 87 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal para niños, equivalente al 27% y 43% de la dosis de referencia aguda (DRA), respectivamente (FAO/OMS, 2016).

5. Límites máximos de residuos (LMR). El LMR recomendado por la FDA en músculo bovino es de 0.010 $\mu\text{g}/\text{gramo}$. La tolerancia está establecida por el 22, 23-dihidroavermectina B1a ($\text{H}_2\text{B1a}$) (FDA, 2011).

6. Ingesta Diaria Admisible (IDA). La IDA recomendada por la FDA es de 5 microgramos/kilogramo de peso corporal (FDA, 2016).

7. Efectos secundarios. Los efectos secundarios son menos fuertes en comparación de otros fármacos utilizados antiguamente como dietilcarbamazina (DEC). Se ha observado prurito, fiebre, erupciones cutáneas, edema, daño ocular y en algunos casos hipotensión postural. Sin embargo, se observó que estas reacciones han sido desarrolladas en pacientes que tienen un número elevado de microfilarias muertas, de manera que no son reacciones inherentes al fármaco (Godfrey, 1994:241).

En Guatemala se realizó un estudio administrando el fármaco a una comunidad hiperendémica cada seis meses por dos años y medio. Como resultado, se observó una reducción en la incidencia de enfermedades cutáneas, así como también, menor número de infecciones ocasionadas por el vector. Inherente a la respuesta, como efectos secundarios se observó prurito y edema facial. Es importante tomar en cuenta que el número e intensidad de efectos secundarios esta correlacionado con el número de microfilarias (Godfrey, 1994:241-242).

8. **Contraindicaciones.** El fármaco está contraindicado en personas hipersensibles y en madres en periodo de lactancia, hasta que el bebé tenga por lo menos tres meses de edad (Wayne y Nerida, 1992).

9. **Toxicología.** En los últimos años el fármaco se ha administrado aproximadamente a 2 millones de personas en una dosis de 0.2 mg/kg, de manera que no presenta una toxicidad significativa (Godfrey, 1994:229).

Sin embargo, pueden presentar astenia, fatiga, dolor abdominal, anorexia, constipación, diarrea, náusea, vómito, somnolencia, vértigo y urticaria, lo que representa un riesgo para personas con buena salud (Vademecum, 2015).

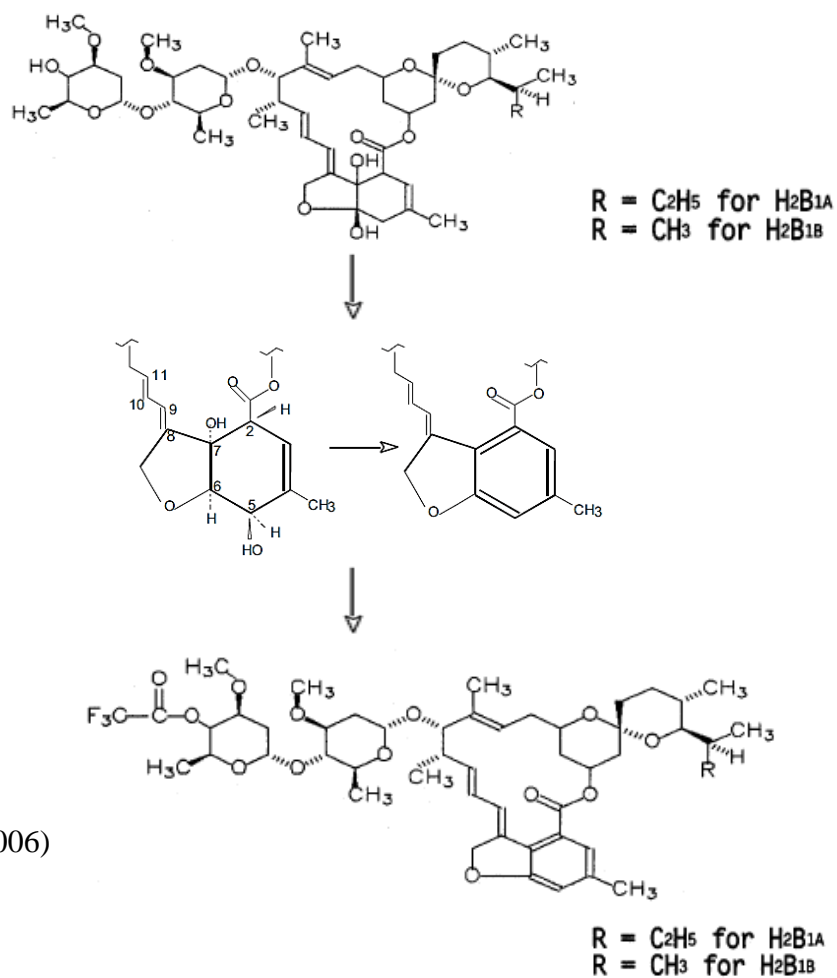
Se han realizado estudios sobre la genotoxicidad del fármaco y se encontraron resultados negativos en cuanto a la síntesis de ADN, ames y en el linfoma de los roedores. Igualmente, se ejecutaron ensayos en ratones, ratas y conejos, administrando a una hembra embarazada dosis tóxicas del fármaco y los hallazgos fueron anomalías en su descendencia. De manera que el fármaco provoca cierta toxicidad en los embriones (Godfrey, 1994:229).

D. Derivatización

La ivermectina no posee un cromóforo fuerte que le permita ser detectada por fluorescencia o Ultravioleta. Por esta razón, es necesario modificar químicamente la molécula, de manera que permita ser detectada y selectiva (Bangchang *et al.*, 2006).

La reacción con 1-metilimidazol y anhídrido trifluoroacético permite que la molécula se convierta en un compuesto fluorescente. Durante la derivatización la molécula pierde agua, lo cual permite que se formen dobles enlaces en los sitios de acción y se forme un anillo aromático. Igualmente, se incorpora el grupo $F_3C-CO-O-$ cedido por el anhídrido trifluoroacético (Bangchang *et al.*, 2006).

Figura No.5: Derivatización de la ivermectina



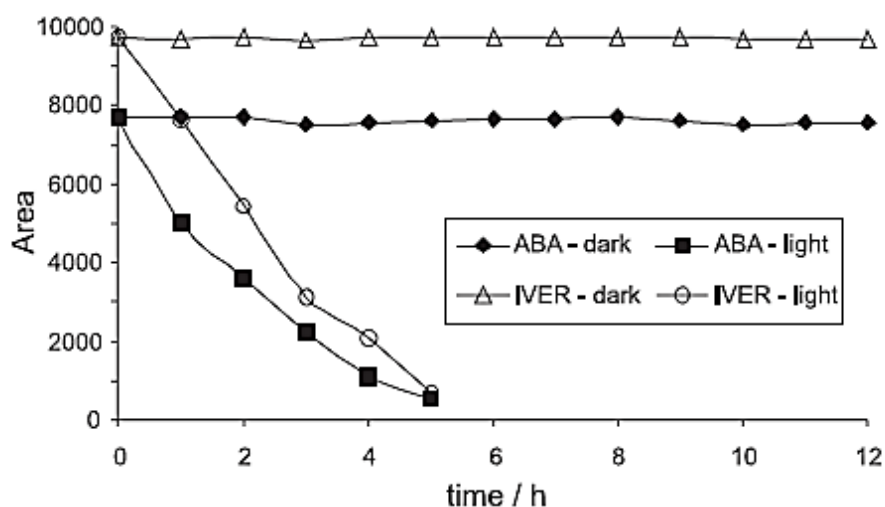
(FAO, 2011)

(Bangchang *et al.*, 2006)

El producto de la derivatización es la ivermectina derivatizada, este compuesto es sensible a la luz y a la temperatura, en efecto, al no tener control de estas condiciones durante la reacción se puede producir una degradación de la molécula derivatizada (Kolberg *et al.*,2009).

En el estudio *Rapid and Accurate Simultaneous Determination of Abamectin and Ivermectin in Bovine Milk by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection* realizado por Kolberg *et al.*, se evaluó la estabilidad de la ivermectina y abamectina derivatizada en presencia o ausencia de luz a temperatura ambiente, como resultado, se observó que el compuesto de ivermectina expuesto a la luz sufrió una degradación del 95% en cinco horas. En contraste con lo anterior, el compuesto protegido de la luz se mantuvo estable por aproximadamente 12 horas. De manera análoga, el compuesto de abamectina sufrió una degradación del 92% en 5 horas de exposición a la luz y protegido de la luz fue estable por 12 horas (Kolberg *et al.*,2009).

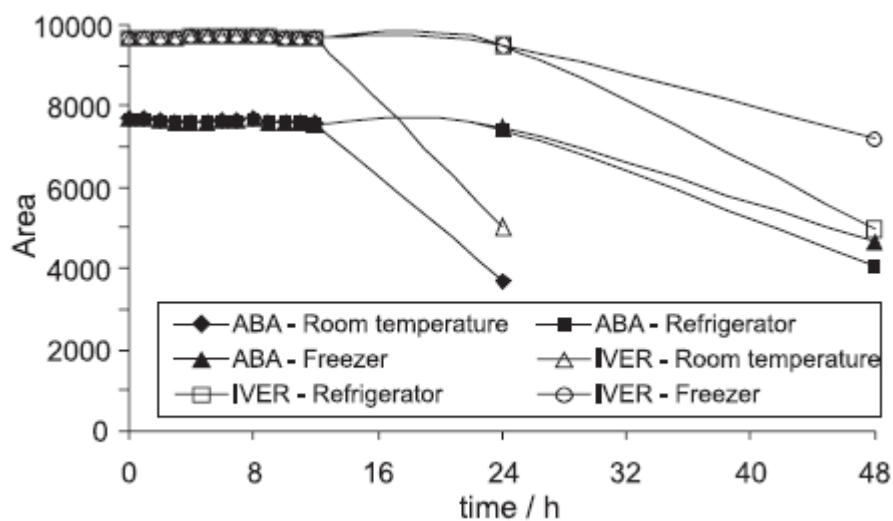
Figura No.6: Estabilidad de la ivermectina y abamectina derivatizada en exposición o protegido de la luz a temperatura ambiente



(Kolberg *et al.*,2009)

Asimismo, se evaluó el compuesto a diferentes temperaturas: temperatura ambiente, refrigerador y *freezer*. Se observó que tanto la ivermectina como la abamectina derivatizada poseen una pequeña degradación a temperatura ambiente cuando se mantiene por más de 12 horas. En efecto, después de 24 horas sufren una degradación del 48.5% para abamectina y 46.4% para ivermectina. Por el contrario, las soluciones que se colocaron en el refrigerador o en el *freezer* tuvieron una mejor estabilidad, ya que no se observó una degradación después de 24 horas. Sin embargo, después de 24 horas en el refrigerador se observó una degradación del 44.8% para el compuesto de abamectina y 46.0% para el de ivermectina. Igualmente, después de 48 horas se observó una degradación de las soluciones colocadas en el *freezer* (35.8% para el compuesto de abamectina y 24.3% para ivermectina) (Kolberg *et al.*,2009).

Figura No.7: Estabilidad de la ivermectina y abamectina derivatizada a diferente temperatura



(Kolberg *et al.*,2009)

E. Método de cuantificación de ivermectina en músculo bovino

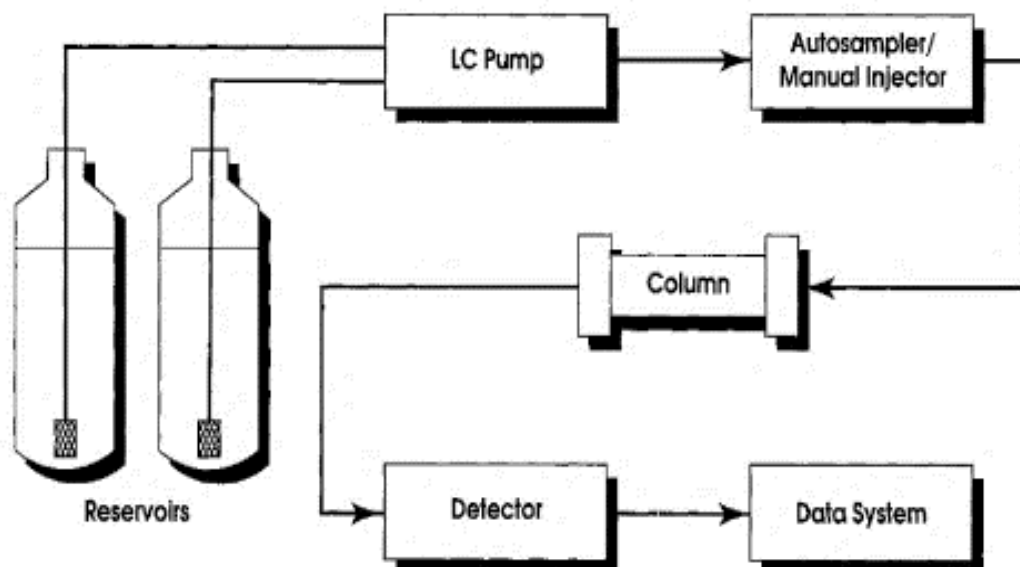
1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

a. Fundamentos y principios básicos. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) es el tipo de cromatografía en el cual se utiliza una fase móvil líquida y una fase estacionaria finamente dividida, así mismo, se somete el líquido a una presión de libras por pulgada cuadrada (psi). Es ampliamente utilizada actualmente ya que permite aislar y determinar especies en materiales orgánicos, inorgánicos y biológicos. En este tipo de cromatografía la fase móvil es un disolvente líquido en el cual se encuentra la muestra como mezcla de solutos. Según el tipo de fase estacionaria se divide en: cromatografía de reparto o de líquido-líquido, cromatografía de adsorción o de líquido-sólido, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad y cromatografía quiral (Skoog, 2010:985).

b. Instrumentación. Para lograr velocidades de flujo satisfactorias con empaquetamientos con un intervalo de tamaños de 3-10 μm , son necesarias presiones de bombeo de centenares de atmósferas (Skoog, 2010:987).

Los componentes principales del cromatógrafo líquido de alta resolución son: los recipientes de los disolventes, la válvula de dosificación de disolvente, el burbujeador de gas, la válvula de retención de entrada y de salida, el filtro de entrada, la bomba, el atenuador de pulso, la válvula de drenaje, la jeringa de purga, el filtro, el regulador de contrapresión, el transductor de presión, la válvula de inyección, la columna y el detector (Skoog, 2010:987).

Figura No.8: Diagrama básico de los componentes de un aparato de HPLC



(Ahuja y Dong, 2005:49)

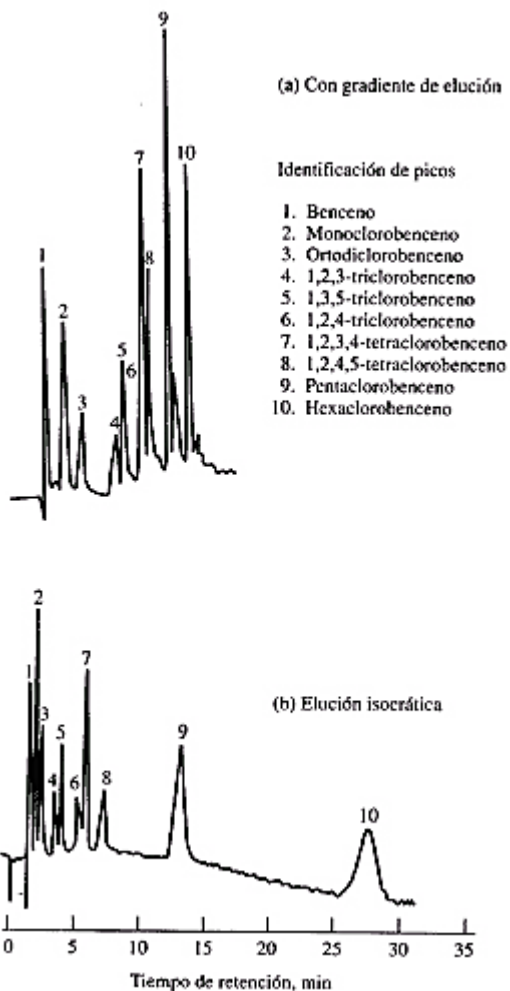
1) Fase móvil y sistemas de tratamiento de disolventes. Los aparatos de HPLC contienen uno o más recipientes de vidrio, cada uno contiene 500 mL o más de un disolvente. Se incluyen también accesorios para eliminar gases disueltos, ya que pueden causar burbujas en la columna y pueden causar ensanchamiento de la banda o partículas que se encuentren en suspensión en los líquidos, porque interceptan en el rendimiento de los detectores. Un método útil es el *sparging* o desgasificador, que consiste en extraer los gases disueltos de un disolvente mediante el burbujeo del gas inerte e insoluble, esto se puede realizar mediante un sistema de bomba de vacío, destilación o un dispositivo de calentamiento y agitación (Skoog, 2010: 988).

La elución de los disolventes puede ser de dos tipos: elución isocrática, cuando la elución con un disolvente o una mezcla de disolventes es constante; igualmente, puede ser elución en gradiente, cuando se utilizan dos o más sistemas de disolventes que son diferentes en cuanto a su polaridad. En este último, las proporciones de los dos disolventes varían de manera automática durante la separación o de un modo escalonado. En efecto, se prefiere la elución en gradiente porque mejora la eficiencia en la separación (Skoog, 2010:988).

2) Sistema de bombeo. Los requisitos de las bombas son: capacidad para producir presiones de hasta 6000 psi, salida libre de pulsos, velocidades de flujo de 0.1-10 mL/min, reproducibilidad de los flujos de 0.5% o mejor, resistencia a la corrosión por diferentes disolventes. Existen tres tipos: las de tipo jeringa impulsadora con tornillo, que producen una salida no pulsada y a pesar de que la velocidad de flujo se controla fácilmente, tienen una baja capacidad y no son apropiadas cuando es necesario el cambio de disolvente; las de vaivén u oscilantes, tienen un volumen interno pequeño, una presión de salida alta, se adapta fácilmente a la elución en gradiente y tiene una velocidad de flujo constante, independiente en gran parte de la contrapresión de la columna y la viscosidad del disolvente (Skoog, 2010:989).

Por último, las bombas neumáticas o de presión constante, son sencillas, de bajo costo y no generan muchos pulsos, tienen una capacidad y una salida de presión limitada, y la velocidad de bombeo depende de la viscosidad del disolvente, de manera que no se adaptan a la elución en gradiente (Skoog, 2010:989).

Figura No.9: Ejemplificación gráfica de la elución con gradiente e isocrática



(Skoog, 2010:988).

3) Sistema de inyección de muestra. Este consiste en un bucle para muestras y su tamaño varía de 5 a 500 μ l. Muchos HPLC incluyen inyector automático, que permite la inyección continua de volúmenes variables (Skoog, 2010:990).

4) Columna. Pueden estar elaboradas de tubos de acero inoxidable, tubos de vidrio o Tygon (para baja presión, menor a 600 psi). Normalmente, tienen una longitud de 10-30 cm y un diámetro interno de 2-5 mm. Igualmente, contienen un empaquetamiento de partículas de 3-10 μm y proporcionan 40 000-60 000 plato por metro, actualmente, algunas pueden llegar a contener hasta 100 000 platos por metro, con un mínimo consumo de disolvente (Skoog, 2010:990).

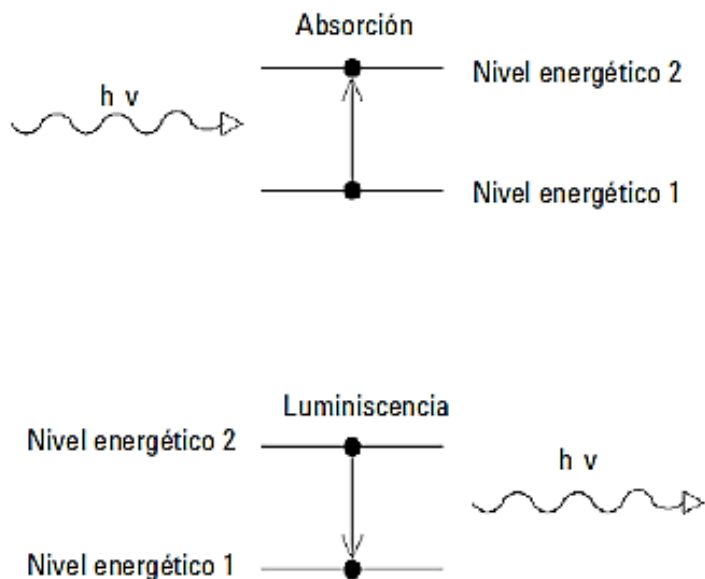
El empaquetamiento comúnmente contiene partículas de sílice, que se sintetizan por aglomeración de partículas submicrónicas de sílice en medios que originan partículas más grandes y diámetro muy uniforme. También, se pueden colocar una precolumna para eliminar partículas y contaminantes de los disolventes, aumentando así la vida de la columna. Igualmente, se utiliza para saturar la fase móvil con la fase estacionaria, provocando la pérdida mínima de la fase estacionaria en la columna analítica (Skoog, 2010:991).

5) Detector de fluorescencia

a) Detección de luminiscencia. La emisión de luz se lleva a cabo cuando las moléculas pasan de un estado excitado a su estado basal. Cuando la excitación de la molécula es producida por la luz, el proceso se nombra fotoluminiscencia (Agilent, 2013).

La emisión de la luz es inversa a la absorción. Los espectros de absorción y emisión de moléculas orgánicas diluidas producen bandas. Si la molécula es compleja, la energía absorbida se divide en varios subniveles de vibración y rotación. Cuando vuelve a su estado basal, pierde la energía de vibración y rotación debido a que se relaja y no emite radiación. Por consiguiente, la molécula pasa a uno de los subniveles de vibración y rotación de su estado fundamental, emitiendo luz (Agilent, 2013).

Figura No.10: Absorción y emisión de luz



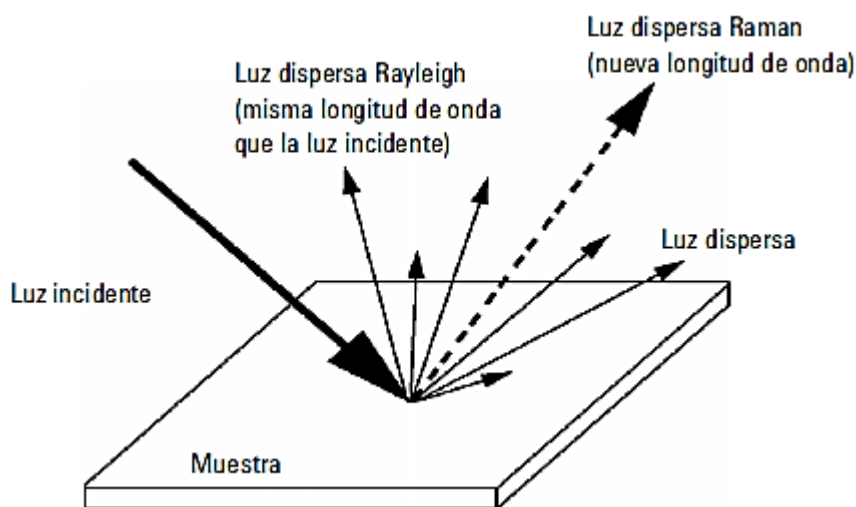
(Agilent, 2013)

La fluorescencia se produce cuando el retraso de la emisión de luz tras la excitación de la molécula se produce entre 10^{-9} y 10^{-5} segundos después de ser iluminada (Agilent, 2013). Los detectores de fluorescencia excitan el analito con un láser y miden la fluorescencia que origina. Estos son muy sensibles, pero solo son útiles con analitos que tienen fluorescencia (Harris, 2003:624).

Para ayudar al analito a ser detectado se puede enlazar covalente a grupos fluorescentes o electroactivos, este proceso es llamado derivatización y se lleva a cabo en la muestra antes de realizar la cromatografía o también se pueden añadir los reactivos al eluato entre la columna y el detector (Harris, 2003:624).

b) Efecto Raman. El efecto Raman se desarrolla cuando la luz incidente excita las moléculas de la muestra que disipan la luz. La mayoría de la luz dispersa tiene la misma longitud de onda que la luz incidente pero otra parte se dispersa a una longitud de onda diferente. Esa luz dispersa inelásticamente es llamada dispersión Raman y se produce por los cambios en los movimientos vibracionales o rotacionales que sufre la molécula (Agilent, 2013).

Figura No.11: Efecto Raman



(Agilent, 2013)

La diferencia entre la energía de luz incidente (E_i) y la luz dispersa Raman (E_s) es igual a la energía que hace que la molécula vibre (E_v). Esa diferencia de energía es llamada desplazamiento Raman. Este desplazamiento se produce según la molécula y el entorno de la misma. La representación de la intensidad Raman ante el desplazamiento Raman se denomina espectro Raman (Agilent, 2013).

$$\text{Ecuación No.1: } E_v = E_i - E_s$$

(Agilent, 2013)

F. Validación de metodologías analíticas

La validación de una metodología analítica consiste en un procedimiento para implantar de manera documentada, pruebas que demuestren científicamente que el método analítico contiene las características de desempeño requeridas para cumplir con los parámetros de las aplicaciones analíticas. Involucra la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y el error sistemático y al azar del procedimiento, no solo dentro de la calibración sino también, en el análisis de muestras reales (RTCA:2006).

1. Parámetros de validación. Estas directrices se aplican con el objetivo de que cumplir con las buenas prácticas de manufactura y las buenas prácticas de laboratorio, garantizando así que el método utilizado es seguro para el control de calidad de medicamentos (RTCA:2006).

a. Exactitud/Veracidad: consiste en la cercanía de los resultados obtenidos por medio del método y el valor verdadero (RTCA:2006).

b. Precisión: correlación entre un grupo de mediciones individuales obtenidas de diversos muestreos de una misma muestra homogénea original o a partir de varias muestras producto de la dilución de la muestra bajo condiciones específicas (RTCA:2006).

c. Especificidad/Selectividad: es la capacidad de evaluar, identificar y medir juntos o separados, los analitos de interés sin que existan interferencias de contaminantes, productos de degradación, excipientes u otras sustancias presentes en la matriz de la muestra (RTCA:2006).

d. Intervalo: consiste entre la anchura entre la concentración inferior y la superior del analito, mediante esta se puede establecer el analito con un nivel apropiado de precisión, exactitud y linealidad (RTCA:2006).

e. Límite de cuantificación: es la cantidad mínima de analito en la muestra que puede ser cuantificado con precisión y exactitud aceptable (RTCA:2006).

f. Límite de detección: es la cantidad mínima de analito que puede ser detectada por una sola medición. No es necesario que sea cuantificada con un valor exacto (RTCA:2006).

g. Linealidad: capacidad de obtener resultados de prueba proporcionales a la concentración de analito en las muestras en un intervalo definido (RTCA:2006).

IV. MARCO METODOLÓGICO

A. Objetivos

1. Objetivo general

Desarrollar, estandarizar y validar un método analítico para la identificación y cuantificación de ivermectina en músculo bovino, a nivel de traza, con materiales, equipo y reactivos brindados por el Laboratorio de Inocuidad.

2. Objetivos específicos

- a. Generar información útil respecto a la validación del método analítico para la identificación y cuantificación de ivermectina en musculo bovino.
- b. Elaborar un método analítico para la cuantificación de ivermectina en músculo bovino por cromatografía líquida de alta resolución.
- c. Verificar que el método analítico cumpla con los parámetros estadísticos de exactitud, precisión, especificidad, linealidad y robustez.

B. Población

La población a estudiar será la ivermectina en músculo de ganado bovino tratado con ivermectina del territorio de Guatemala al que tenga acceso el Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA).

C. Muestra

No se llevó a cabo la evaluación de la muestra.

D. Procedimiento

1. Instalaciones. Laboratorio de Inocuidad VISAR/MAGA. Km. 22 Barcena, Villa Nueva.

2. Procedimiento

a. Preparación de la solución madre de ivermectina ($125 \pm 1 \mu\text{g/mL}$). Se pesó en una balanza analítica $12.5 \pm 0.1 \text{ mg}$ de estándar de ivermectina y se transfirió a un balón de aforo ámbar de 100 mL. Luego, se aforó con acetonitrilo y se mezcló. Tomar en cuenta la pureza del estándar para obtener la concentración deseada.

b. Preparación de la solución de ivermectina ($0.50 \mu\text{g/mL}$). Se agregó con una micropipeta 400 μL de la solución madre a un balón de aforo ámbar de 100 mL. Se aforó con acetonitrilo y se mezcló para homogenizar la solución.

c. Preparación de la solución 1-metilimidazol/acetonitrilo. Se añadió con una probeta de 10 mL, 10 mL de acetonitrilo y 10 mL de 1-metilimidazol a un recipiente de vidrio ámbar con tapadera. Luego, se mezcló.

d. Preparación de la solución anhídrido trifluoroacético/acetonitrilo. Se añadió con una probeta de 10 mL, 10 mL de acetonitrilo y 10 mL de anhídrido trifluoroacético a un recipiente de vidrio ámbar con tapadera. Luego, se mezcló.

Las soluciones se almacenaron en un refrigerador a $-2 \text{ }^\circ\text{C}$.

e. Preparación de la curva de calibración. Se realizó la curva de calibración con patrones estándar de ivermectina de 0, 7.5, 15, 30, 60 y 120 ppb. Con este propósito, se transfirió a viales de vidrio de 20 mL (envueltos con papel kraft para evitar exposición a la luz), 0.0, 37.5, 75.0, 120.0, 300.0 y 600.0 μL de la solución de ivermectina, respectivamente. Se evaporó con nitrógeno a sequedad, se reconstituyó en 2.5 mL de acetonitrilo y se mezcló con vortex por 30 segundos. Se agregó 200 μL de la solución 1-metilimidazol/acetonitrilo y se mezcló con vortex por 30 segundos. Seguido, se agregó 200 μL de solución anhídrido trifluoroacético/acetonitrilo y se mezcló con vortex por 30 segundos. Se dejó derivatizando cada estándar en la oscuridad por 30 minutos. Al finalizar, se filtró directo a los viales ámbar y se inyectó en el HPLC.

3. Validación del método de cuantificación. Se hizo con un ensayo de categoría I, según el Reglamento Técnico Centroamericano. Para los parámetros se tomó como guía los establecidos por la *United States Pharmacopeia 29 National Formulary 24*.

a. Exactitud. La exactitud se determinó por medio de tres replicas y mediante la determinación del porcentaje de error con respecto a la media. Como criterio de aceptación se tomó un rango de porcentaje de 95.0% - 102.0%, establecido por la *United States Pharmacopeia 29 National Formulary 24*

b. Precisión. La precisión se determinó mediante la repetibilidad de la cuantificación seis veces, bajo las mismas condiciones, por el mismo analista, con el mismo aparato y reactivos, en un mismo laboratorio con una serie de análisis. Igualmente, se calculó la desviación estándar de los datos, bajo un criterio de aceptación de $\leq 20\%$ (para alimentos).

c. Linealidad. Para la determinación de la linealidad, primeramente, se calculó el rango en base al valor menor de cuantificación y el mayor obtenido en los resultados. Tomando en cuenta el criterio de aceptación establecido, de 95.0% - 102.0%, según la USP 29 - NF 24.

Por consiguiente, se calculó el límite de detección, el límite de cuantificación y el coeficiente de determinación.

d. Especificidad/selectividad. La especificidad se determinó mediante la diferenciación de la matriz en presencia de diversos componentes de la muestra. Igualmente, se realizó la estimación de la desviación estándar relativa.

E. Equipo

Se utilizó el cromatógrafo líquido de alta resolución del Laboratorio de Inocuidad de alimentos del MAGA, marca Agilent Serie 1200 con un detector de fluorescencia Agilent Serie 1200 G1321A con número de serie DE60558457. Se trabajó bajo las siguientes condiciones:

Cuadro No.2: Condiciones del cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de fluorescencia

Parámetro	Condición
Fase móvil	Agua/metanol grado HPLC 20:80 (v/v)
Velocidad de flujo	1.0 mL/min
Temperatura de la columna	30 °C
Volumen de inyección	100 µL
Tiempo de corrida	23 minutos
Condiciones del detector	
Longitud de onda de excitación	370 nm
Longitud de onda de emisión	440 nm

F. Diseño de investigación

El diseño de investigación consistió en la búsqueda de un método analítico para la identificación y cuantificación de ivermectina presente en músculo bovino, utilizando cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia. Se analizaron los resultados por medio de estadística descriptiva.

G. Análisis estadístico

Para la determinación de los parámetros requeridos para la validación se utilizó estadística descriptiva. Los parámetros que se analizaron son los siguientes:

- Regresión lineal
- Media aritmética
- Desviación estándar
- Desviación estándar relativa

Igualmente, se utilizó ChemStation®, que es el Software que permitió la obtención y manejo de datos resultantes del análisis realizado por el cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de fluorescencia.

V. MARCO OPERATIVO

A. Recabación y tratamiento de datos

La recabación de datos se llevó a cabo por medio del Software ChemStation® del cromatógrafo líquido de alta resolución marca Agilent Serie 1200 con detector de fluorescencia Agilent Serie 1200.

Para el tratamiento de los datos con la estadística descriptiva se utilizó el programa Microsoft Excel 2016.

B. Recursos

1. Recurso humano

- a. Autora: Jenifer Andrea Padilla Revolorio
- b. Asesora: Licenciada Ana Luisa Mendizábal de Montenegro
- c. Colaborador: Doctor Herber Ronaldo Morales Estévez y personal del Laboratorio de Inocuidad de alimentos del MAGA
- d. Colaborador: Doctor Élfego Rolando López García

2. Recurso material

- a. Documentos
 - 1) Método oficial de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)
 - 2) Artículos científicos
 - 3) Manual del detector de fluorescencia Agilent Serie 1200

b. Suministros

- 1) Hojas
- 2) Tinta
- 3) Papel Kraft
- 4) Tape

c. Reactivos

- 1) Acetonitrilo grado HPLC
- 2) 1-metilimidazol redistilado (99%)
- 3) Anhídrido trifluoroacético (99%)
- 4) Metanol grado HPLC
- 5) Agua grado HPLC
- 6) Agua purificada
- 7) Estándar de ivermectina
- 8) Nitrógeno gaseoso

d. Equipo

- 1) Cromatógrafo líquido de alta resolución marca Agilent 1200 Series
- 2) Detector de fluorescencia Agilent Serie 1200 G1321A con número de serie DE60558457
- 3) Columna Zorbax Eclipse Plus C18 Analytical 4.6x120 mm 5-Micron
- 4) Micropipetas de 50 μ L, 200 μ L y 1000 μ L
- 5) Vortex
- 6) Balanza analítica (± 0.1 mg)
- 7) Refrigerador

e. Cristalería

- 1) Viales de vidrio de 20 mL (para preparación de los estándares)
- 2) Viales de vidrio ámbar de 2.0 mL (para inyección de los estándares)
- 3) Beakers de 100 y 250 mL
- 4) Balones de aforo ámbar de 25, 100 y 250 mL
- 5) Probetas de 10 mL
- 6) Pipeta Pasteur de vidrio

VI. RESULTADOS

El Cuadro No. 3, que se muestra a continuación, incluye los resultados de la curva obtenida en partes por millón, la misma se determinó con la finalidad de identificar la presencia de ivermectina, así como de observar el comportamiento lineal a una concentración alta.

Cuadro No.3: Linealidad de la curva en ppm

Concentración		225 ppm			
Área	Área 1	Área 2	Promedio	Desviación estándar	% RSD
	7.9549	10.2757	9.12	1.641	18.00%
Tiempo de retención (min)	6.356	6.932	6.64	0.407	6.13%
Concentración		300 ppm			
Área	Área 1	Área 2	Promedio	Desviación estándar	% RSD
	14.7445	17.1500	15.95	1.701	10.67%
Tiempo de retención (min)	6.950	6.951	6.95	0.001	0.01%
Concentración		10 000 ppm			
Área	Área 1	Área 2	Promedio	Desviación estándar	% RSD
	22.8750	23.7181	23.30	0.596	2.56%
Tiempo de retención (min)	6.945	6.858	6.90	0.062	0.89%
Concentración		20 000 ppm			
Área	Área 1	Área 2	Promedio	Desviación estándar	% RSD
	30.0146	31.7544	30.88	1.230	3.98%
Tiempo de retención (min)	6.849	6.793	6.82	0.040	0.58%
Concentración		30 000 ppm			
Área	Área 1	Área 2	Promedio	Desviación estándar	% RSD
	37.7220	39.8668	38.79	1.517	3.91%
Tiempo de retención (min)	6.647	6.564	6.61	0.059	0.89%

Mediante análisis estadístico descriptivo según los siguientes parámetros, se obtuvo lo siguiente:

Promedio

$$\text{Ecuación No.2: } \bar{X} = \frac{\sum X}{n}$$

Desviación estándar

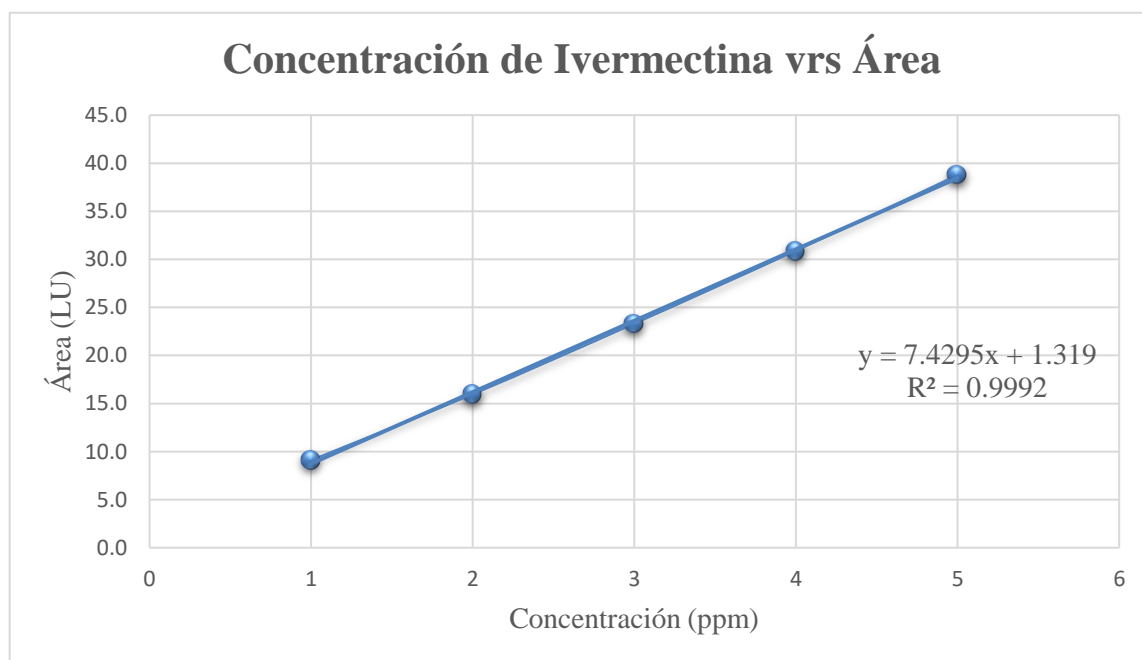
$$\text{Ecuación No.3: } S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD, por sus siglas en inglés)

$$\text{Ecuación No.4: } \%RSD = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100$$

En esta gráfica se evidencia que a concentraciones de trabajo existe una correlación entre la concentración de ivermectina y el área obtenida. Es decir, existe linealidad.

Figura No.12: Gráfico de la curva de calibración en ppm



Refiriéndose “1” a 225 ppm, “2” a 300 ppm, “3” a 10 000 ppm, “4” a 20 000 ppm y “5” a 30 000 ppm.

En la siguiente tabla se indican los resultados de las inyecciones de estándares a concentración en partes por billón.

Cuadro No.4: Repetibilidad y linealidad de la curva en ppb

Concentración		7.5 PPB								
Área	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5	Área 6	Promedio	Desviación estándar	% RSD	
	5.1000	5.1000	5.4000	5.0000	5.2000	5.0000	5.13	0.151	2.93%	
Tiempo de retención (min)		4.904	5.002	5.006	5.103	5.171	5.178	5.06	0.108	2.14%
Concentración		15 PPB								
Área	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5	Área 6	Promedio	Desviación estándar	% RSD	
	3.9000	3.6000	2.6000	3.9854	4.4840	5.2943	3.98	0.899	22.59%	
Tiempo de retención (min)		4.493	4.460	4.439	4.412	5.071	4.486	4.56	0.252	5.53%
Concentración		30 PPB								
Área	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5	Área 6	Promedio	Desviación estándar	% RSD	
	4.2938	4.8577	4.2945	4.1866	4.3355	3.9391	4.32	0.301	6.98%	
Tiempo de retención		4.298	4.293	4.304	4.277	4.259	4.248	4.28	0.023	0.53%
Concentración		60 PPB								
Área	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5	Área 6	Promedio	Desviación estándar	% RSD	
	4.3456	3.8117	3.8279	3.8214	3.7046	3.5079	3.84	0.278	7.24%	
Tiempo de retención (min)		4.017	4.033	4.001	3.985	4.003	4.016	4.01	0.017	0.41%
Concentración		120 PPB								
Área	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5	Área 6	Promedio	Desviación estándar	% RSD	
	3.4745	3.6049	3.3215	2.8851	3.3874	2.9700	3.27	0.286	8.73%	
Tiempo de retención (min)		3.981	3.974	3.966	3.939	3.946	3.970	3.96	0.017	0.42%

El coeficiente de correlación para la curva de calibración fue de 0.6907, por lo que se demuestra que no existe linealidad.

El rango teórico en que se basaron los diferentes ensayos no se pudo verificar.

Cuadro No.5: Rango teórico

Límite inferior	Límite superior
7.5 ppb	120 ppb

Se efectuaron 20 inyecciones del blanco para determinar el límite de detección y el límite de cuantificación. A continuación, se muestran los resultados obtenidos:

Cuadro No.6: Blanco

BLANCO													
Área	Área 1	Área 2	Área 3	Área 4	Área 5	Área 6	Área 7	Área 8	Área 9	Área 10	Área 11	Área 12	Área 13
	2.806	2.732	2.765	2.193	1.793	1.963	1.603	1.987	1.887	2.262	2.1662	2.0748	2.1499
Tiempo de retención (min)	4.108	4.143	4.059	4.061	4.063	4.091	4.099	4.084	4.088	4.099	4.081	4.084	4.059
Área	Área 14	Área 15	Área 16	Área 17	Área 18	Área 19	Área 20	Promedio	Desviación estándar	% RSD			
	2.2912	1.691	2.238	2.6468	2.3170	2.072	2.018	2.18	0.343	15.73%			
Tiempo de retención (min)	4.07	4.07	4.12	4.084	4.109	4.084	4.057	4.09	0.023	0.56%			

Como se puede observar en el cuadro anterior, se obtuvo un porcentaje de desviación estándar relativo alto para las áreas y un valor no mayor al 2% para el tiempo de retención.

Los resultados que se presentan a continuación, indican una aproximación de los límites de detección y cuantificación. Se determinó cada uno según las siguientes ecuaciones:

Límite de detección

Ecuación No.5: $LD = \overline{X_{blanco}} + 3 \cdot S_{blanco}$

Límite de cuantificación

Ecuación No.6: $LC = \overline{X_{blanco}} + 10 \cdot S_{blanco}$

Cuadro No.7: Límites de detección y cuantificación

Límite de detección	Límite de cuantificación
3.2131 ppb	5.6172 ppb

Muestra

No se realizó la prueba en la muestra de músculo bovino ya que no se logró la validación del método.

VII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

A. Metodología y equipo

La metodología utilizada se basó en un método analítico establecido por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés). Anteriormente, se había llevado a cabo otra metodología analítica en la cual no se utilizaba nitrógeno gaseoso para llevar a sequedad, sin embargo, se determinó que su uso era vital ya que eliminó la humedad que interfería en la derivatización, dando como resultado un espectro limpio, con menos contaminantes. No obstante, el nitrógeno utilizado no pasó por un filtro, es por esto que no se garantizó que el vial estuviera libre de contaminación.

La reacción de derivatización no fue sencilla, debido a que es fácilmente afectada por los cambios en las condiciones ambientales. Al momento de desarrollarla se tuvo en cuenta que existen dos variables indispensables para que se lleve a cabo: la luz y la temperatura. Los compuestos derivatizados, así como las soluciones derivatizantes se degradan ante la exposición a la luz y a una alta temperatura (Kolberg *et al.*, 2009). Para el desarrollo de este método fue indispensable controlar la cantidad de luz, ya que el laboratorio para elaboración de muestras estaba expuesto a la luz solar. Considerando esto, se cubrió con papel kraft la parte frontal de la campana de extracción y la cristalería. Asimismo, se trabajó en un ambiente a 19°C. De esta manera se aseguró que la reacción se llevara a cabo.

Del mismo modo, fue indispensable controlar el tiempo de derivatización. Puesto que en los cromatogramas se pudo observar una disminución del área cuando los estándares derivatizados se inyectaban después de 24 horas a partir de la reacción. Esto se debe a que los compuestos son estables por 12 horas a temperatura ambiente, al transcurrir las 12 horas comienzan a degradarse (Kolberg *et al.*,2009). La reacción se llevará a cabo sin degradación del estándar derivatizado.

Se evaluó la longitud de onda óptima por medio de una variación en la longitud de onda de excitación (340, 350, 365, 370 nm) y en la de emisión (440, 450, 465 y 470 nm). De acuerdo con el método se permite una variación de ± 20 nm. Considerando esto, se determinó la longitud de onda en la cual la molécula derivatizada de ivermectina tenía un incremento en la excitación y emitía mayor energía. Igualmente, se utilizó la herramienta *Multiple Wavelengths and Spectra* del detector de fluorescencia, para realizar un análisis en tres dimensiones que permitió determinar la longitud de onda del pico máximo.

Se llevó a cabo una variación en la proporción de fase móvil y en el flujo de la columna con el fin de separar los picos y obtener una mejor definición. Dado que tienden a unirse unos con otros y esto dificulta la caracterización del mismo. A su vez, se inyectó 50 μL más de cada estándar que lo que pedía el método original, estableciéndose 100 μL por inyección, como volumen óptimo para obtener un pico de área mayor.

B. Curva en partes por millón

La curva realizada en concentraciones en ppm (Cuadro No. 3) mostró una linealidad aceptable, siendo el coeficiente de correlación 0.9992. Esto indicó que a esas concentraciones existe una correlación lineal entre la concentración de ivermectina y el área. Además, la respuesta del equipo fue directamente proporcional a las concentraciones evaluadas.

Igualmente, se pudo comprobar en esta curva que a menor concentración existe un aumento del porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD, por sus siglas en inglés). Es decir, a menor concentración existe una dispersión mayor de las áreas respecto a la media. Por otra parte, el %RSD del tiempo de retención fue menor al 2% en todas las concentraciones, excepto en 225 ppm, esto indica que el equipo mantuvo el mismo valor en la señal de salida durante las inyecciones. A pesar de esto, no se puede denotar como reproducible ya que únicamente se realizaron dos inyecciones de cada estándar para evaluar la señal del detector a altas concentraciones (ppm) antes de comenzar con las concentraciones de trabajo (ppb).

C. Curva en partes por billón

La curva realizada en ppb (Cuadro No.4) no mostró linealidad, siendo el coeficiente de correlación 0.6907. Esto indicó que no hay una relación proporcional entre la concentración de ivermectina y el área obtenida. Además, no se obtuvo una respuesta apropiada del equipo ya que no fue equivalente a esas concentraciones.

Asimismo, se observó en esta curva que a mayor concentración hubo un aumento del %RSD. Teóricamente, debería ser lo contrario. Se debe agregar que, el tiempo de retención se corrió de manera significativa en cada punto y no coincidió con el tiempo de retención obtenido en los estándares en ppm, por lo que no se puede asegurar la repetibilidad, ni estabilidad.

Dicho lo anterior, se infirió que el pico estaba presente a las concentraciones en ppm y no fue detectado en ppb. De modo que, no se pudo continuar con la validación, ya que los resultados continuaban siendo los mismos a pesar de hacer ajustes en la metodología y en el equipo. Se vio la posibilidad de mejorar estos resultados con el uso de un estándar interno, pero no se logró contar con este durante el tiempo que duró el proyecto.

D. Blanco

Se observó un porcentaje de desviación estándar relativa alto, lo que indicó la dispersión de las áreas respecto a la media. Teóricamente, debería de disminuir al aumentar las inyecciones, sin embargo, no sucedió. Por otro lado, se observó un %RSD menor al 2% para el tiempo de retención, que demostró la salida del pico en un tiempo similar en todas las inyecciones.

E. Límite de detección y límite de cuantificación

Los límites que se muestran en el Cuadro No. 7 fueron una aproximación del límite de detección y cuantificación bajo las condiciones de trabajo y con el equipo empleado. Teniendo en cuenta que, las condiciones de trabajo no fueron las adecuadas no se puede dar certeza del resultado.

F. Muestra

No se realizó la prueba en la muestra ya que no se obtuvieron resultados favorables con el estándar.

Esto fue el resultado de varios factores poco certeros: para iniciar, el estándar de ivermectina provisto por el Laboratorio de Inocuidad no fue un estándar de referencia certificado, se llevó a cabo todos los análisis de la metodología con una materia prima. Segundo, hubo carencia de seguridad en cuanto al buen funcionamiento del detector de fluorescencia, porque inicialmente no se calificó el equipo adecuadamente, no se calibró con la sustancia establecida para ese detector y no se contó con un informe que garantizará que la intensidad de la lámpara era constante y no variaba a las longitudes de onda de trabajo. Tercero, se vio la necesidad de cambiar de fritas en un lapso de tiempo corto por acumulación de suciedad o degradación de la misma, debido a que se observó un aumento en la presión de la columna.

Es probable que la contaminación de la frita y la inestabilidad de los picos en la columna haya sido producto de una oxidación producida en el equipo, por los reactivos utilizados, esto se presume por referencias de la literatura que no se pudieron comprobar, pero también se puede deber a un desgaste anormal de piezas internas del equipo. De igual manera, era necesario utilizar un estándar interno de Abamectina, según el método de referencia en el que se basó el estudio y no se contó con este. El estándar interno hubiera permitido obtener una relación de áreas que podían haber influido en la linealidad, al compensar las variaciones que generan incertidumbre en la respuesta del equipo.

Con respecto a las instalaciones, se observó que no eran las adecuadas para llevar a cabo la validación, ya que no se pudo tener un control de la luz y la temperatura en el laboratorio de elaboración de muestras y en el laboratorio de instrumental. En primer lugar, al laboratorio de elaboración de muestras ingresaban rayos de luz solar. Esto no se pudo controlar por completo a pesar de hacer ajustes, debido a la infraestructura del laboratorio. En segundo lugar, había ingreso de polvo en el laboratorio de instrumental. Finalmente, la temperatura en el laboratorio de instrumental no era la adecuada y esto pudo interferir con la estabilidad de la ivermectina derivatizada.

VIII. CONCLUSIONES

- A. Con los reactivos, materiales y el equipo disponible en el Laboratorio de Inocuidad Visar MAGA, se desarrolló la fase inicial para el diseño, desarrollo y estandarización, que permitirán validar la metodología para identificación y cuantificación de ivermectina en musculo bovino. Por falta de estándares de referencia, estándar interno y condiciones de equipo no fue posible estandarizar el método para someterlo al proceso de validación.
- B. Se generó información útil respecto a la validación del método analítico para la identificación y cuantificación de ivermectina en musculo bovino, la que puede utilizarse al disponer de materiales y equipo calificado.
- C. No se verificó que el método analítico cumpliera con los parámetros estadísticos de exactitud, precisión, especificidad, linealidad y robustez. A causa de parámetros desfavorables inherentes al equipo, infraestructura y a las condiciones de trabajo del Laboratorio de Inocuidad.
- D. Es indispensable utilizar un estándar certificado e implementar el uso de un estándar interno para trabajar con trazas de compuestos.
- E. No se puede llevar a cabo la evaluación en la muestra hasta que se cuente con un método validado.

IX. RECOMENDACIONES

- A. Para estandarizar y validar el método debe utilizarse un estándar certificado, que tenga una confiabilidad adecuada y una pureza no menor del 95%.
- B. Debe incorporarse al método un estándar interno. Esto proveerá mejores resultados, trabajando con una relación de áreas que compense variaciones propias del método.
- C. Evitar la exposición de la ivermectina a la luz y a altas temperaturas durante el procedimiento ya que pueden incidir negativamente, causando degradación de los compuestos derivatizados.
- D. El análisis a altas concentraciones (ppm) debe efectuarse también en el detector de arreglo de diodos y examinar los resultados en tres dimensiones, para garantizar que toda la ivermectina se está derivatizando y que se está trabajando a la longitud de onda del pico máximo.
- E. El control de temperatura del autoinyector en el HPLC es de suma importancia y trabajar a menor temperatura. Esto aumentará la estabilidad de la ivermectina derivatizada.
- F. Para eliminar humedad y evitar contaminación al momento de evaporar los estándares y la muestra, debe desarrollarse el proceso utilizando evaporación con nitrógeno.

- G. Estudiar una posible influencia del pH, de la solución final derivatizada, en posibles degradaciones tanto de frita, como columna y así evitar una reacción de oxidación y posible inestabilidad.

- H. La estandarización y validación del método debe efectuarse con material y equipo que demuestren estar en condiciones adecuadas.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Agilent Technologies. (2013). *Detector de fluorescencia*. Recuperado de: http://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1321-95014_FLD-B-C_USR_ES.pdf [Con acceso el 13 de Agosto de 2016]
2. Ahuja, S., & Dong, M. (2005). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC* (1st ed., Vol. 6). United Kingdom: Elsevier. 679.
3. Bangchang, K., Banmairuroi, V., & Choemung, A. (2006). High-Performance Liquid Chromatographic Method for the determination of Ivermectin in plasma. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 37(5), 848–858.
4. Bennett, D. C., & Cheng, K. M. (2012). Ivermectin residues in squab. *Poultry Science*, 91(11), 2808–2811.
5. British Pharmacopoeia. (2013). *Ivermectin*. Séptima edición. Versión 17.0. Ph. Eur. Monograph 1336.
6. Campbell, W. C. (2012). *Ivermectin and Abamectin*. Nueva York: Springer Science & Business Media.
7. Canga, A., Prieto, S., Diez, J., Martínez, N., Vega, M., & Vieitez, J. (2009). *The pharmacokinetics and metabolism of ivermectin in domestic animal species.*, 179(1), 25–37.

8. Chou, H.-K., Lai, C.-Y., Chen, T.-H., & Yen, G.-C. (2004). «*A Multiresidue Method for the Determination of Abamectin, Doramectin, Moxidectin, Ivermectin, Milbemectin A3, and Milbemectin A4 Residues in Bovine Muscle Using HPLC with Fluorescence Detection*». *Journal of Food and Drug Analysis*, 12, 146–153.
9. Cruz-Reyes, A., & Camargo-Camargo, B. (2000). *Glosario de términos en Parasitología y Ciencias Afines* (Primera). México, D.F.: Plaza y Valdes.
10. EPA. (2016). *Method 641. The Determination of Thiabendazole in Municipal and Industrial Wastewater*. <https://www.bucksci.com/catalogs/EPA%20Method%20-%20641%20-%20thiabendazole%20by%20Isocratic%20HPLC%20with%20Flouresence%20de%20tector.pdf> [Con acceso el 7 de noviembre de 2016]
11. European Medicines Agency (1996). *Committee for Veterinary Medicinal Products Ivermectin*. Recuperado de: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014499.pdf [Con acceso el 13 de Agosto de 2016]
12. Florey, K. (1988). *Analytical Profiles of Drug Substances* (Vol. 17). San Diego, California: Academic Press. 814

13. Food and Drug Administration. (2010). *ivomec® (ivermectin) Injection for Cattle and Swine*. Recuperado de: <https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfo.cfm?archiveid=27632> [Con acceso el 13 de agosto de 2016]
14. Food and Drug Administration. (2011). Tolerances for Residues of New Animal Drugs in Food. Code of Federal Regulations, Sec. 556.334 Ivermectin, Title 21. Revised April 1, 2011.
15. Food and Drug Administration. (2016). Tolerances for Residues of New Animal Drugs in Food. Code of Federal Regulations, Sec. 556.344 Ivermectin, Title 21. Volume 6. Revised April 1, 2016.
16. Food and Drug Administration/Organización Mundial de la Salud. (2016). *Comité del CODEX sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos*. Recuperado de: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/ru/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252FMeetings%252FCX-730-23%252FWD%252Frv23_inf1s.pdf [Con acceso el 13 de agosto de 2016]
17. Godfrey, C. R. A. (1994). *Agrochemicals from Natural Products*. Nueva York: Marcel Dekker, Inc.

18. Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo* (Tercera). Barcelona, España: Reverté.
19. Instituto Veterinario Onderstepoort. (2013). *METHOD: RAVER 034 HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF AVERMECTINS IN KIDNEY, LIVER, MUSCLE AND FAT WITH FLD*. Recuperado de: <https://nucleus.iaea.org/fcris/methods/Avermectins-RAVER%20034Rev7Final.pdf> [Con acceso el 13 de Agosto de 2016]
20. Junquera, P. (2016). *Ivermectin*. Recuperado de: http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2344&Itemid=2996 [Con acceso el 13 de agosto de 2016]
21. Katzung *et al.* (2012). *Farmacología básica y clínica*. México. 12ª Edición. McGraw Hill. 1218.
22. Kolberg, D., Presta, M., Wickert, C., Adaime, M., & Zanella, R. (2009). Rapid and Accurate Simultaneous Determination of Abamectin and Ivermectin in Bovine Milk by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(7), 1220–1226.
23. Nagata, Tomoko, *et al.* (2003). «Simultaneous Determination of Residual Antiparasitic Lactones in Bovine Muscle and Liver by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection». *Journal of AOAC International*, 86(3), 490–493.

24. Pietruk, K., & Jedziniak, P. (2013). «Determination of Ivermectin in Medicated Feeds by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection». *The Scientific World Journal*, 2013 (362453), 1-5.
25. Reglamento Técnico Centroamericano. (2006). *Productos farmacéuticos. validación de métodos analíticos para la evaluación de la calidad de los medicamentos*. RTCA 11.03.39:06. Recuperado de: <http://www.mspas.gob.gt/files/Descargas/Servicios/reglamentosLABORATORIO/RTCA%2011033906.pdf>. [Con acceso el 10 de septiembre de 2016]
26. Samol, A. (2007). *Estandarización del método utilizado en el Laboratorio Nacional de Salud para la Identificación y Cuantificación de Clotrimazol en óvulos sólidos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución*. http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2579.pdf [Con acceso el 7 de noviembre de 2016]
27. Skoog, D., West, D., Holler, F., & Crouch, S. (2005). *Fundamentos de Química analítica* (Octava). México, D.F.: CENGAGE Learning.
28. United States Pharmacopeia 29- National Formulary 24. (2005). *Ivermectin*. Volumen 3. 1211.

29. United States Department of Agriculture. (2011). Determination of Ivermectin, Doramectin, and Moxidectin by HPLC. Revised March 28, 2011. Recuperado de: https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/87680e50-d76b-407b-9d94-d2ecc37b3cd0/CLG_AVR_04.pdf?MOD=AJPERES [Con acceso el 13 de agosto de 2016]
30. Vademecum. (2015). *Ivermectina*. <http://www.vademecum.es/principios-activos-ivermectina-p02cf01> [Con acceso el 7 de noviembre de 2016]
31. Vercruysse, J., & Rew, R. S. (2002). *Macrocyclic Lactones in Antiparasitic Therapy*. Nueva York: CABI.
32. Wayne, A., & Smith, N. (1992). *Ivermectin*. Recuperado de: <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/ivermect.htm> [Con acceso el 13 de agosto de 2016]

XI. ANEXOS

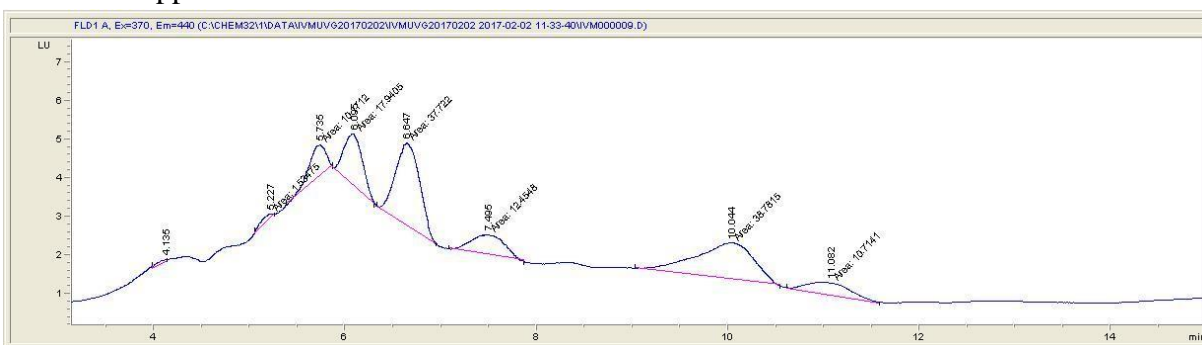
A. Procedimiento para el lavado de cristalería

1. Lavar con detergente líquido disuelto en agua del grifo y desaguar con agua del grifo (Samol, 2007).
2. Desaguar una vez con agua destilada (Samol, 2007).
3. Desaguar una vez con agua grado HPLC (Samol, 2007).
4. Secar la cristalería por la parte externa (EPA, 2016).
5. Almacenar la cristalería invertida y tapada con papel aluminio (EPA, 2016).
6. Antes de utilizarla lavar por la parte interna con el solvente a utilizar.

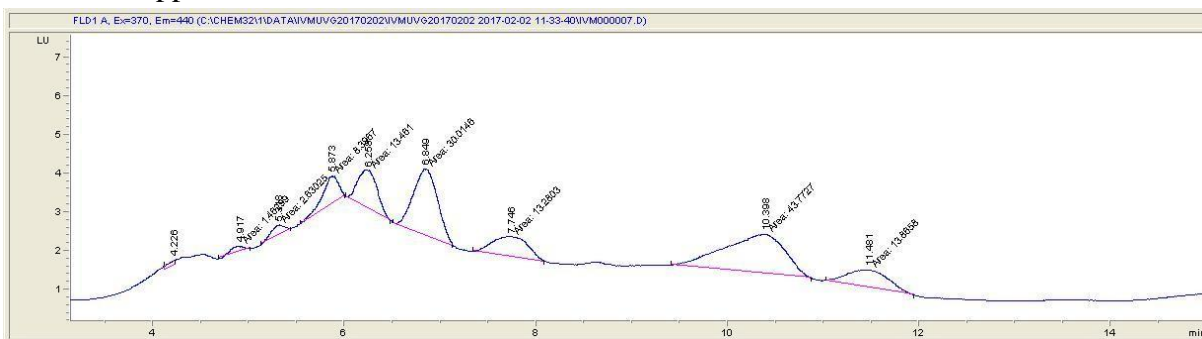
B. Cromatogramas en dos dimensiones

Resultados de la curva realizada en partes por millón. Se realizaron 2 inyecciones de cada estándar, el tiempo de cada corrida fue de 15 minutos, el volumen de inyección fue 100 μ L, se corrió a una longitud de onda de emisión de 440 nm y a una longitud de onda de excitación de 370 nm, la velocidad de flujo fue de 1.0 mL/min y la fase móvil fue 80:20 metanol/agua. Se evaporó con nitrógeno gaseoso según el método de la FAO.

1. 30 000 ppm



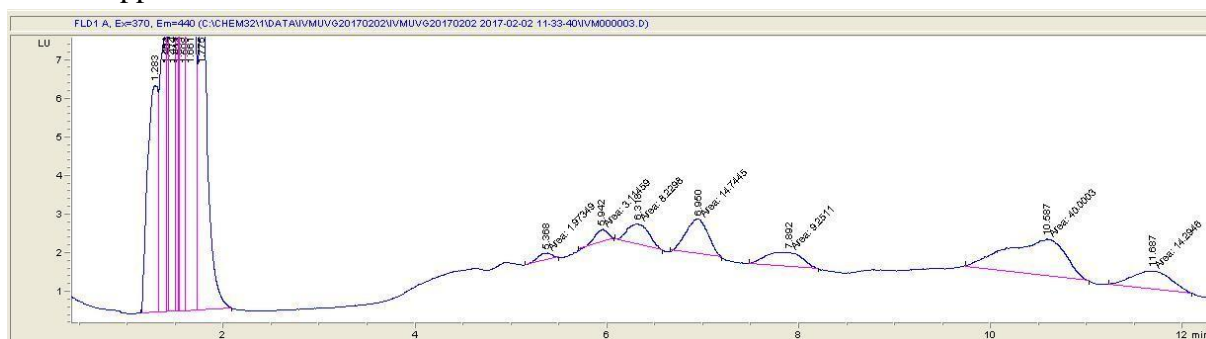
2. 20 000 ppm



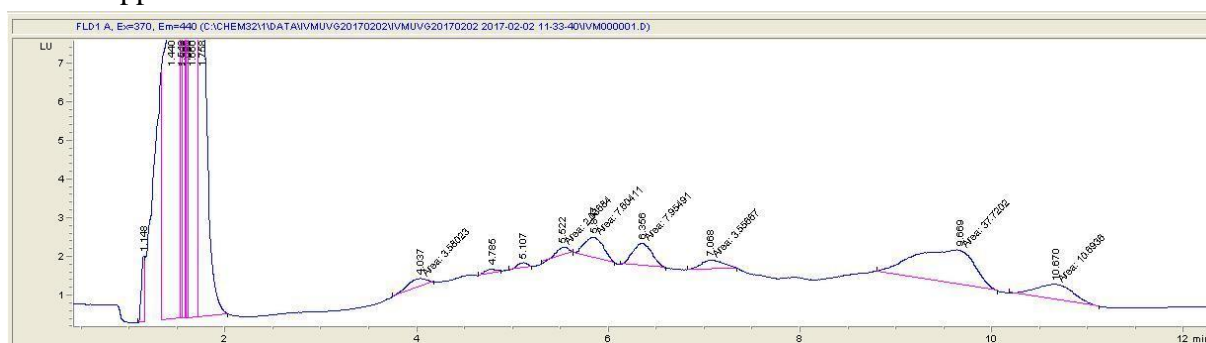
3. 10 000 ppm



4. 300 ppm

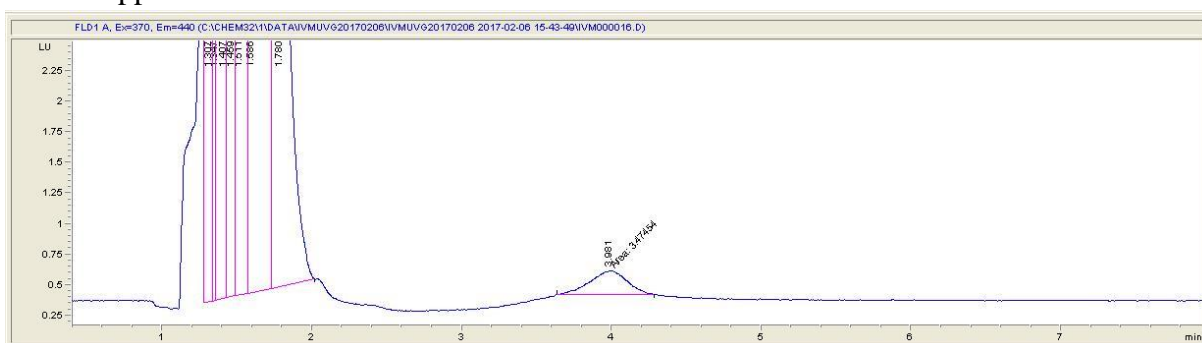


5. 225 ppm

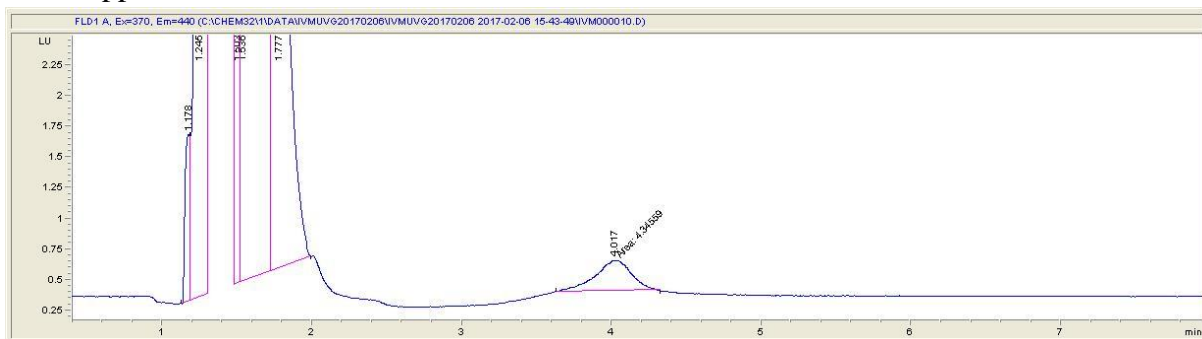


Resultados de la curva realizada en partes por billón. Se realizaron 6 inyecciones de cada estándar, el tiempo de cada corrida fue de 23 minutos, el volumen de inyección fue 100 μ L, se corrió a una longitud de onda de emisión de 440 nm y a una longitud de onda de excitación de 370 nm, la velocidad de flujo fue de 1.0 mL/min y la fase móvil fue 80:20 metanol/agua. Se evaporó con nitrógeno gaseoso según el método de la FAO.

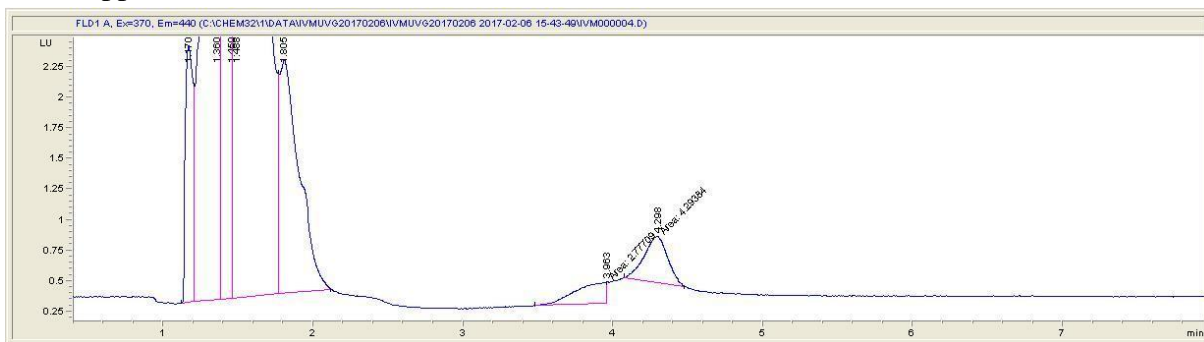
6. 120 ppb



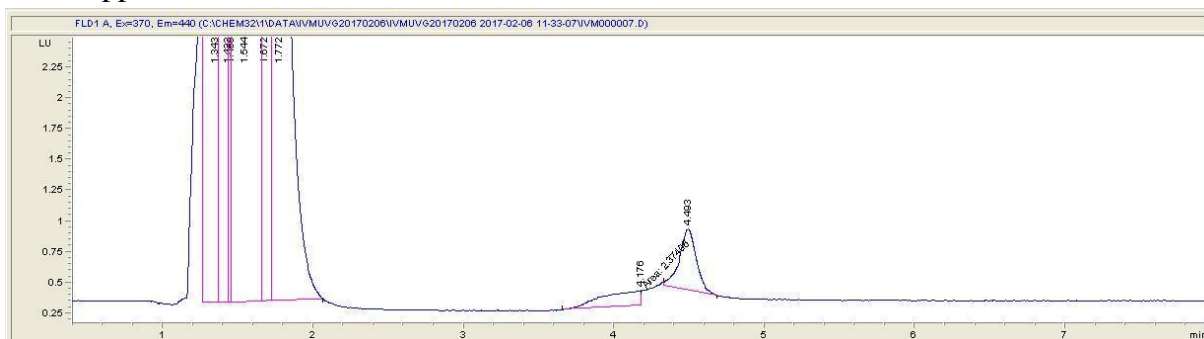
7. 60 ppb



8. 30 ppb

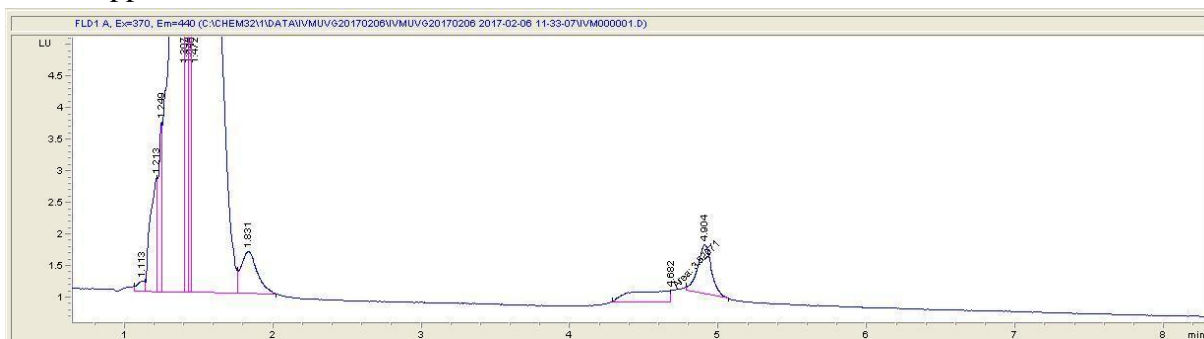


9. 15 ppb



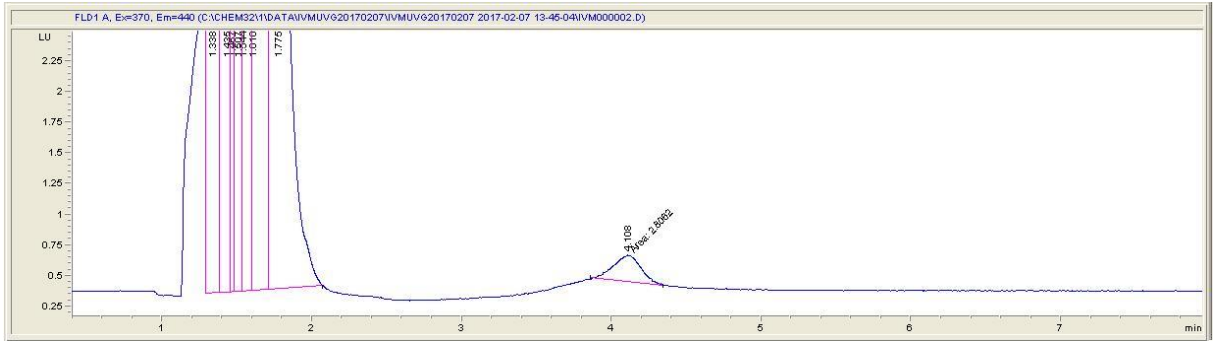
Área en 4.493 = 3.9

10. 7.5 ppb



Área en 4.904 = 5.1

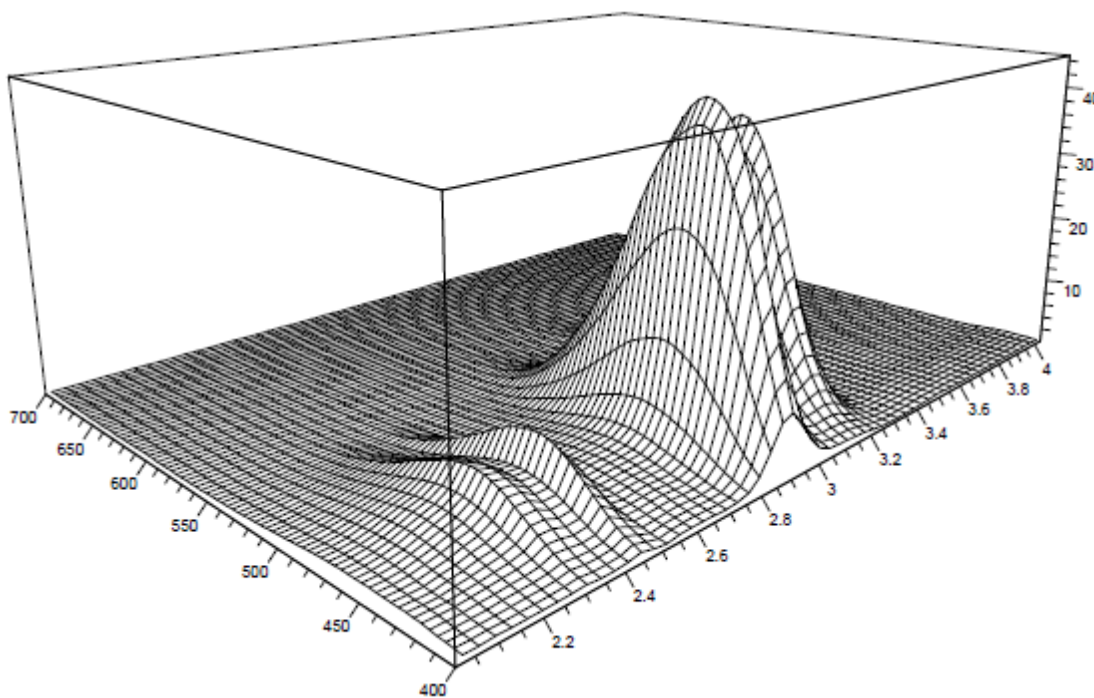
11. Blanco (0 ppb)

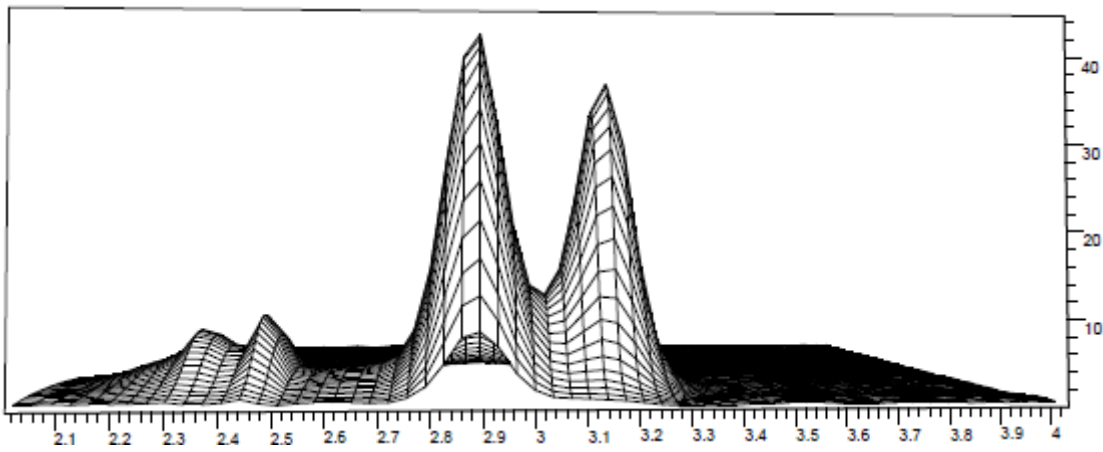
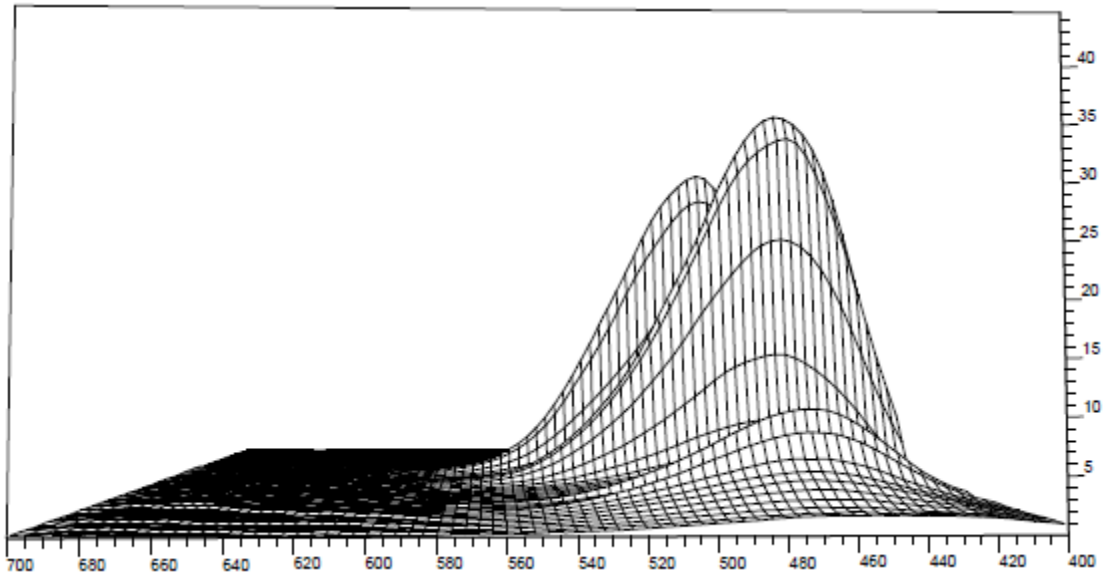


C. Cromatogramas en tres dimensiones

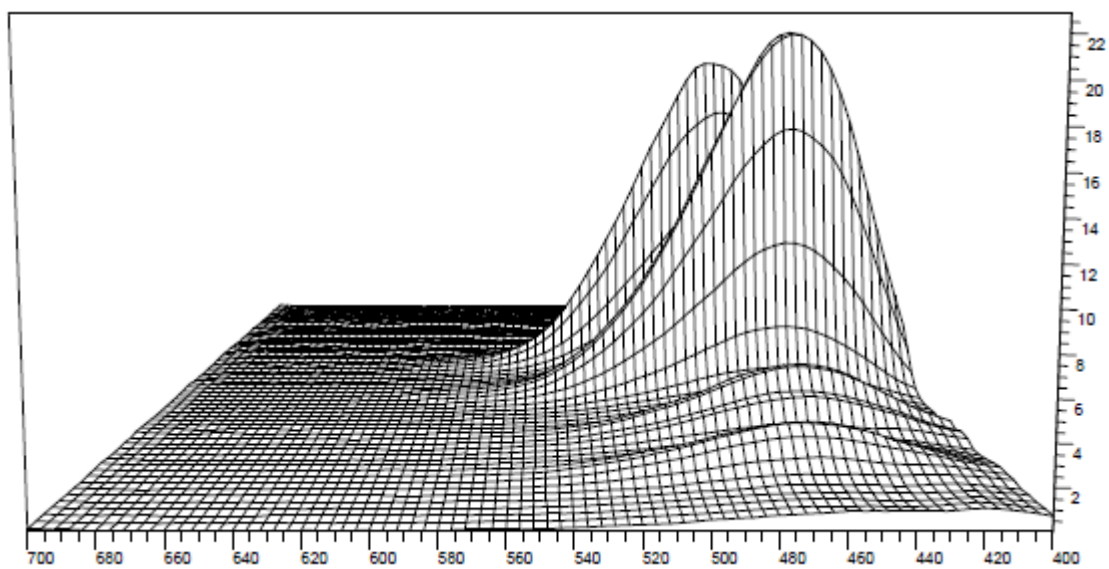
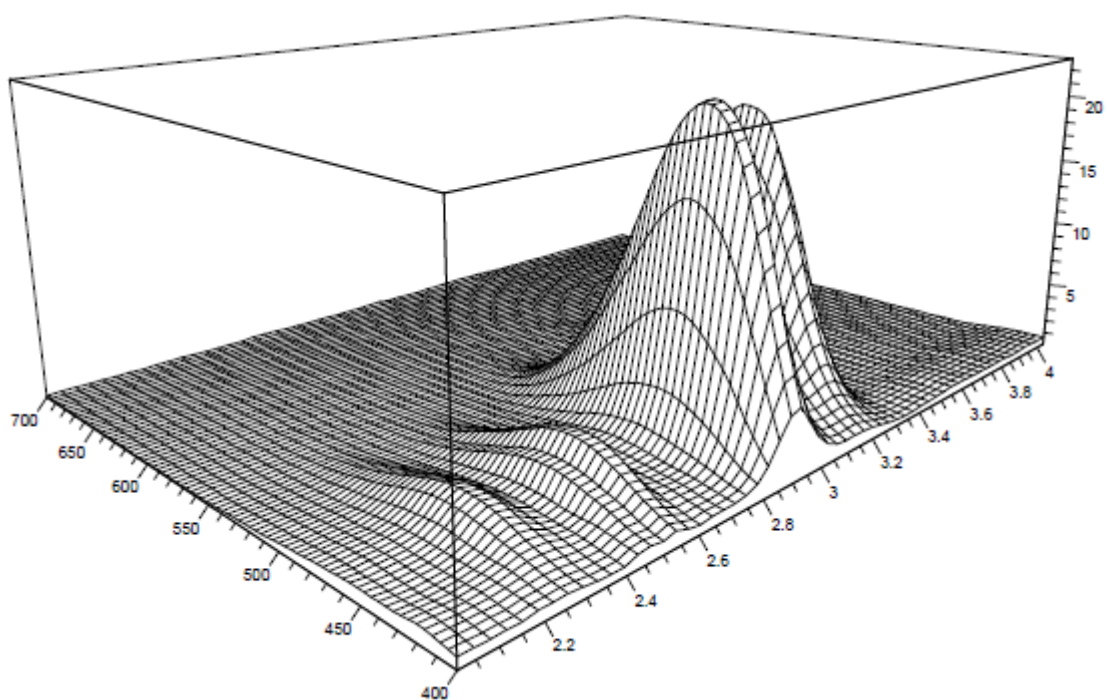
Análisis realizado para determinar la mejor longitud de onda de excitación y de emisión. A continuación, se muestran los resultados a una longitud de onda óptima con una velocidad de flujo de 1.8 mL/min, volumen de inyección de 50 μ L, fase móvil 97:3 metanol/agua, el tiempo de cada corrida fue de 15 minutos, se corrió a una longitud de onda de emisión de 440 nm y a una longitud de onda de excitación de 370 nm. No se evaporó con nitrógeno gaseoso.

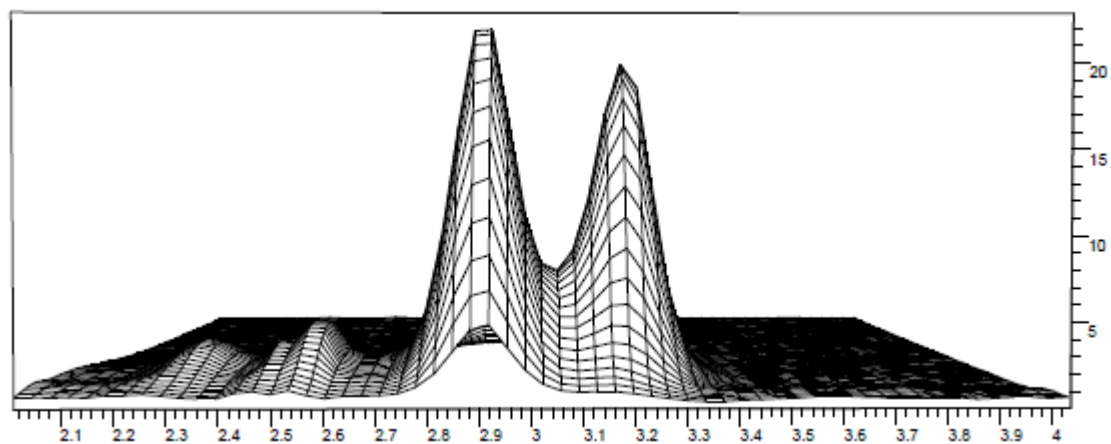
1. 40 000 ppm



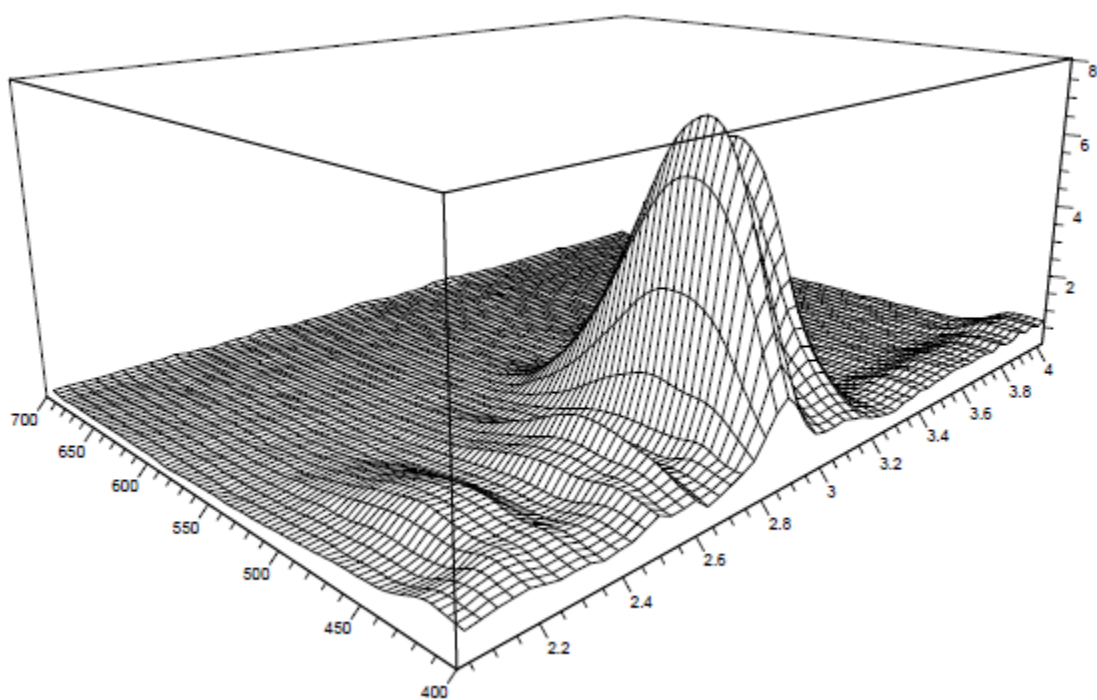


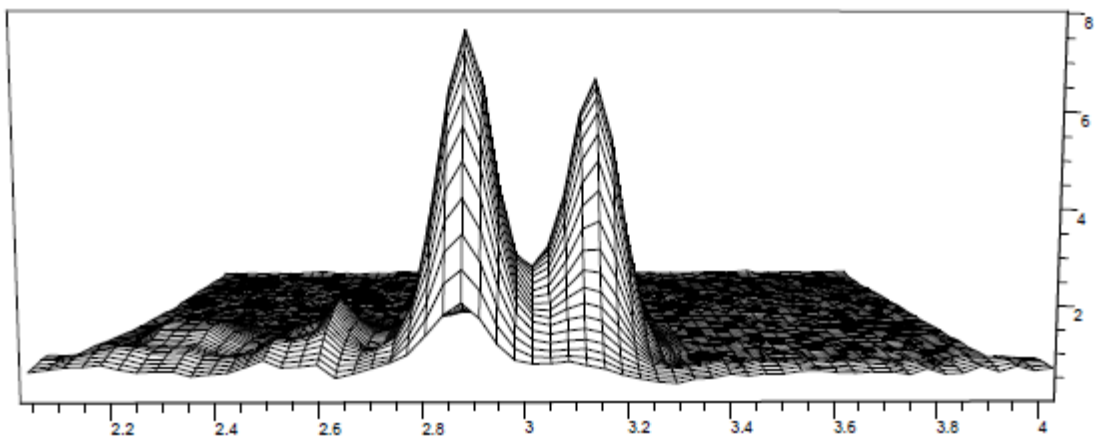
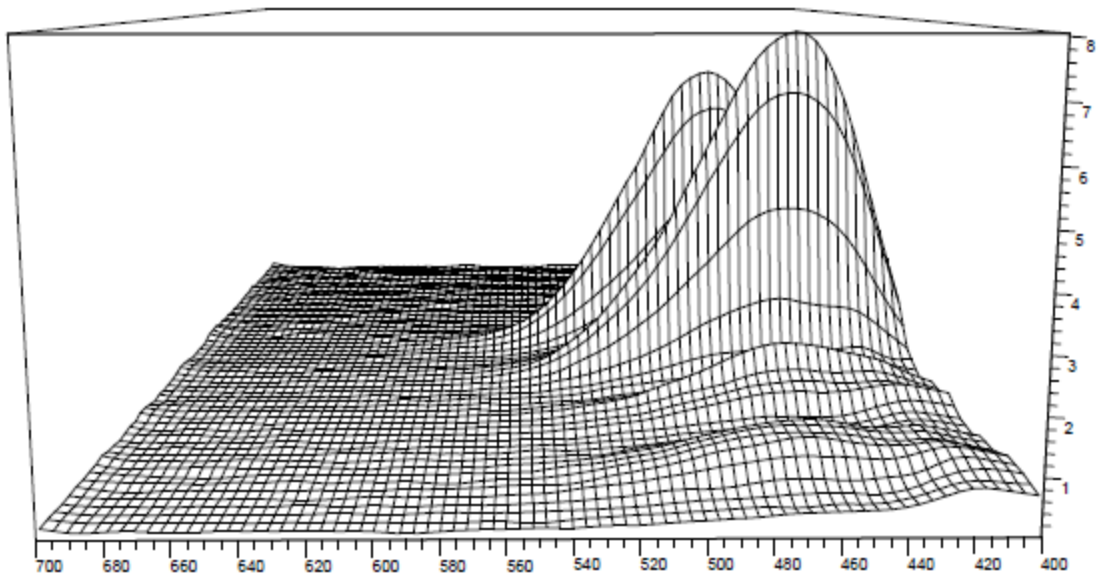
2. 30 000 ppm





3. 10 000 ppm





D. GLOSARIO

1. Aclaramiento: consiste en la capacidad del cuerpo para eliminar el fármaco, es decir, la velocidad de excreción en base a la concentración (Katzung 2012).
2. Agonista: activan los receptores para que emitan la señal en consecuencia de la unión con él (Katzung 2012).
3. Antihelmíntico: tratamiento utilizado para tratar infecciones provocadas por helmintos (Katzung 2012).
4. Biodisponibilidad: cantidad de fármaco sin cambios que llega a la circulación sistémica luego de ser administrado por cualquier vía (Katzung 2012).
5. Cromatografía: método utilizado para la separación de componentes presentes en mezclas complejas (Skoog, 2005).
6. Ectoparásito: organismo que vive en un huésped y se beneficia de la relación con él (Valenzuela *et al.*,1996).
7. Espectro de actividad: capacidad que posee un medicamento para eliminar una gama de microorganismos (Katzung 2012).
8. Farmacocinética: efectos que ejerce el organismo sobre el fármaco. Conlleva una serie de pasos desde que el fármaco ingresa al organismo (Katzung 2012).

9. Farmacodinamia: efectos que ejerce el fármaco sobre el organismo (Katzung 2012).
10. Hidrofílico: molécula que posee afinidad con el agua (Skoog, 2005).
11. Higroscópico: capacidad de una sustancia de absorber la humedad del medio que los rodea (Skoog, 2005).
12. Metodología analítica: método utilizado para la identificación o cuantificación de un analito presente en una matriz (Skoog, 2005).
13. Microfiliarias: pequeñas larvas de un nematodo (Cruz y Camargo, 2001).
14. Neurotransmisor: sustancia química que transmite impulsos nerviosos en la sinapsis (Katzung 2012).
15. Oncocercosis: infecciones producidas por filarias de *Onchocerca volvulus*, los pacientes generalmente presentan nódulos en la región lumbar superior (Cruz y Camargo, 2001).
16. Oviposición: proceso fisiológico vital para los insectos hematófagos para la ovogénesis (Cruz y Camargo, 2001).
17. Ovogenésis: desarrollo de los ovarios de un insecto hematófago (Cruz y Camargo, 2001).

18. Quelante: sustancia antagonista que forma un complejo fuerte con iones de metales pesados (Katzung 2012).
19. Queratitis: inflamación de la córnea (Cruz y Camargo, 2001).
20. Semivida: tiempo requerido para reducir a la mitad la concentración del fármaco en el cuerpo durante la eliminación (Katzung, 2012).

