

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO Y DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE IVERMECTINA EN TEJIDOS DE OVINO

Validation of an Analytical Method and Determination of Ivermectin Residues in Sheep Tissues

María José Núñez, Cristina Palma, Marcia Araneda, Ignacio Cabezas y Rubén Pérez

Laboratorio de Farmacología, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Concepción Campus Chillán. Casilla 537, Chillán, Chile. E-mail: rubperez@udec.cl

RESUMEN

Se realizó un estudio con el objetivo de validar un método analítico sensible y confiable para la detección de residuos de ivermectina (IVM) en muestras de hígado, riñón, músculo y grasa, junto con determinar las concentraciones del fármaco en tejidos de ovinos tratados por vía subcutánea. Muestras de tejidos libres de fármaco fueron sobrecargadas con concentraciones de IVM entre 1 y 50 ng/g (hígado, riñón y músculo); 5 a 200 ng/g (grasa), luego fueron sometidas a extracción en fase sólida y analizadas por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Para el estudio de residuos se utilizaron 12 ovinos Suffolk Down de $27,8 \pm 1,3$ kg de peso, los que fueron tratados con 0,2 mg/kg de IVM vía subcutánea, luego se sacrificaron grupos de 3 animales a los 1,5; 7; 14 y 21 días post tratamiento. La ausencia de interferencias y una adecuada simetría de los cromatogramas indica una buena especificidad del método analítico empleado para la detección de IVM en los tejidos analizados. Los porcentajes de recuperación fluctuaron entre 70 a 93,2%. El límite de cuantificación se estableció en hígado: 0,48 ng/g; riñón: 1,02 ng/g; músculo: 0,18 ng/g y grasa: 2,65 ng/g. La validación de la metodología analítica demostró adecuados valores de sensibilidad, precisión y exactitud que permiten obtener resultados confiables para la detección y cuantificación de residuos de IVM en tejidos de ovinos. En los ovinos tratados con IVM, las mayores concentraciones de residuos fueron observadas a los 1,5 días post tratamiento en hígado ($281,7 \pm 116,95$ ng/g) y grasa ($248,67 \pm 90,85$ ng/g), los que persistieron hasta el día 21 con concentraciones de $0,63 \pm 0,2$ ng/g y $4,07 \pm 2,25$ ng/g, respectivamente. Las menores concentraciones de residuos de IVM fueron observadas en las muestras de músculo.

Palabras clave: Ivermectina, HPLC, validación, residuos, ovinos.

ABSTRACT

A study was undertaken in order to validate a precise and reliable analytical method for the detection of ivermectin's (IVM) tissue residues in sheep, and to know the patterns of the drug concentrations depletion in edible tissues such as liver, kidney, muscle and fat, from treated animals by subcutaneous route. Drug free tissue samples were fortified with increasing concentrations of IVM (1 to 50 ng IVM/g for liver, kidney and muscle; and 5 to 200 ng IVM/g for adipose tissue) and then were subjected to solid phase extraction and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). Twelve sheep weighing 27.8 ± 1.3 kg, were treated with 0.2 mg/kg of IVM by subcutaneous route, and then were slaughtered in groups of three animals at 1.5, 7.0, 14.0, and 21.0 days post treatment. The specificity of the method was demonstrated by the absence of interferences and the adequate symmetry of chromatograms. The percentage of recovery ranged from 70 to 93.2% for all tissues analyzed and different drug concentrations. The limit of quantification of the method was established in 0.48 ng/g for liver; 1.02 ng/g for kidney; 0.18 ng/g for muscle and 2.65 ng/g for adipose tissue. The validated analytical methodology showed satisfactory results of sensitivity, precision and accuracy that allow it use for the detection and quantification of tissue residues of IVM in sheep. From the tissues samples of sheep treated with IVM, the higher concentrations were found in liver (281.7 ± 116.95 ng/g) and adipose tissue (248.67 ± 90.85 ng/g) at 1.5 days, and the drug concentrations in both tissues were maintained for a period of 21 days post treatment with 0.63 ± 0.2 ng/g and 4.07 ± 2.25 ng/g respectively. The lowest concentrations of IVM in tissues were observed in muscle samples.

Key words: Ivermectin, HPLC, validation, residues, sheep.

INTRODUCCIÓN

La ivermectina es una lactona macrocíclica, obtenida a partir de la fermentación del actinomiceto del suelo el *Streptomyces avermectilis* [2, 19], que se caracteriza por ser un antihelmíntico de amplio espectro, que es efectivo sobre gran cantidad de parásitos nematodos y artrópodos que afectan a los animales domésticos, denominándose por estas características endectocida [22]. Su mecanismo de acción se basa en la afinidad que presenta sobre los canales iónicos selectivos a cloro, regulados por glutamato presentes en nematodos y artrópodos, llamándose así receptores gluCl. Estos receptores están localizados principalmente en células musculares somáticas como faringe, útero y neuronas asociadas, por lo que el fármaco al unirse al receptor aumenta la permeabilidad al cloro produciendo una hiperpolarización de membrana [17], afectando la motilidad y el bombeo faríngeo en los parásitos produciendo la muerte de éstos por inanición [11, 18].

La ivermectina es un fármaco muy liposoluble que se distribuye ampliamente por la circulación debido a su lenta liberación, desde el tejido graso que actúa como sitio de depósito, alcanzando altas concentraciones en la mucosa del tracto gastrointestinal, el pulmón y la piel que son tejidos donde se localizan preferentemente los parásitos [13, 14, 26]. Se ha demostrado que la gran cantidad de tejido adiposo que presentan los ovinos contribuye a una mayor persistencia de los fármacos del grupo de las avermectinas en plasma y en tejidos [1].

Los métodos disponibles para cuantificar las concentraciones de ivermectina en muestras biológicas son capaces de determinar la presencia de residuos del fármaco en tejidos con una resolución de hasta partes por billón (ppb), por lo que el fármaco es fácil de detectar en alimentos de origen animal como carne, leche o huevos [5]. Se ha demostrado que la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección de fluorescencia es el método más utilizado para determinar residuos de ivermectina en tejidos [25].

La validación de la metodología analítica para la determinación de residuos químicos en tejidos comestibles incluye todos los procedimientos necesarios para demostrar que el método utilizado es confiable y reproducible por otros investigadores para la determinación de las concentraciones de un analito en una matriz biológica y que puede ser aplicada en forma segura y que representen las condiciones reales en las cuales se encuentra el compuesto [7, 16, 20, 21, 24]. Por lo tanto, la validación es una herramienta fundamental para demostrar que la metodología analítica es segura y confiable para el propósito establecido [24] y también juega un rol significativo en la evaluación e interpretación de los resultados obtenidos.

El objetivo del presente trabajo fue validar un método sensible y confiable para detectar y evaluar la presencia de residuos de ivermectina en tejidos de ovinos tratados por vía subcutánea.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de tejidos. Para validar la metodología analítica se obtuvieron muestras de hígado, riñón, músculo y grasa procedentes de un ovino no tratado con fármacos.

Reactivos. El estándar de ivermectina (principalmente dihidroavermectina B1a) se obtuvo de Sigma (Lote 56HO254, Sigma Chemical, St. Louis, EUA). Los solventes acetonitrilo, metanol y agua grado HPLC se obtuvieron de Merck (Alemania) y el ácido acético de EM Science (EM Industries, INC, Gibbstown, New Jersey, EUA). Los reactivos para derivatización ácido trifluoroacético y N-metilimidazol grado HPLC se adquirieron de Sigma (EUA).

Equipos. Para el análisis se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (Shimadzu®, Kioto, Japón), que consiste en: un sistema controlador (modelo SCL-10), un módulo liberador de solventes (modelo LC-10 Atvp) con unidad de gradiente de baja presión (modelo FCV-10 Alvp) y desgasificador (modelo DGU-14 A). También contiene un horno para columna (modelo CTO- 10 Asvp) y un detector espectrofluorométrico (modelo RF-10 Axl).

Soluciones estándar. Las soluciones estándar de ivermectina se prepararon por diluciones sucesivas a partir de una solución madre (1 mg/mL) para obtener las soluciones de 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5 ng IVM/ μ L disueltas en acetonitrilo para la elaboración de las curvas de calibración en hígado, riñón y músculo. También se prepararon soluciones de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 ng IVM/ μ L disueltas en acetonitrilo para la elaboración de las curvas de calibración en tejido adiposo.

Procedimientos de extracción. Para la extracción de ivermectina desde tejidos se utilizó la técnica descrita por Lifschitz y col [15]. Las muestras de tejido blanco libres de fármaco (1 g para hígado, riñón y músculo; y 0,1 g para grasa) obtenidas posterior al faenamiento de un animal no tratado, se sobrecargaron con las soluciones estándar de ivermectina usando 10 μ L de cada solución para obtener concentraciones finales de 1; 5; 10; 25 y 50 ng IVM/g de tejido (hígado, riñón y músculo), y concentraciones finales de 5; 10; 25; 50; 100 y 200 ng IVM/g para tejido adiposo. Posteriormente, a las muestras de hígado, riñón y músculo sobrecargadas con las soluciones de ivermectina, se les adicionó 0,5 mL de agua HPLC y 2 mL de acetonitrilo (4°C) y se agitaron en un mezclador (Vortex, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, EUA) por 20 min, luego se sonicaron en un baño de ultrasonido (Aquasonic, VWR Scientific, West Chester, PA, EUA) por 20 min para posteriormente centrifugar las muestras a 4000 rpm a 4°C por 10 min. El sobrenadante de cada muestra se transfirió a tubos de ensayo y se le adicionaron 4 mL de agua HPLC y se centrifugó a 3000 rpm por 10 min y luego se sometió a extracción en fase sólida.

Las muestras de tejido adiposo libre de fármaco obtenidas (0,1 g), se depositaron en viales de 2 mL y se sobrecargaron con las soluciones estándar de ivermectina usando 10 μ L

de cada solución, para obtener concentraciones finales de 5; 10; 25; 50; 100 y 200 ng IVM/g de grasa, posteriormente se les adicionó 0,125 mL de agua HPLC y 0,5 mL de acetonitrilo (4°C) y se colocaron en un agitador horizontal termostático (KB Lee, Daiki Science, Corea) a 300 rpm por 20 min y a 35°C, luego se colocaron en un baño de ultrasonido por 20 min y posteriormente centrifugar las muestras a 4000 rpm a 14°C por 10 min. El sobrenadante de cada muestra se transfirió a tubos de ensayo y se le agregaron 2 ml de agua HPLC, luego se centrifugó y posteriormente se sometió a extracción en fase sólida.

Los sobrenadantes obtenidos se sometieron a extracción en fase sólida mediante columnas de separación en fase reversa de 100 mg/mL (Supelclean LC18, Supelco®, Bellefonte, PA, EUA) las que previamente se acondicionaron con 2 mL de metanol y 2 mL de agua HPLC. Luego de pasar el sobrenadante, las columnas se lavaron con 1 mL de agua HPLC, 1 mL metanol:agua (25:75 v/v) y secadas al vacío. El eluido fue colectado con 4 mL de metanol para las muestras de hígado, riñón y músculo y con 2 mL de metanol para tejido adiposo, en tubos de ensayo de 10 mL.

Derivatización. El eluido colectado se secó bajo flujo continuo de nitrógeno en un baño termostático a 60°C. El residuo seco obtenido en cada tubo se disolvió en 100 µL de una solución de N- metilimidazol en acetonitrilo (1:1 v/v) y 150 µL de una solución de anhídrido trifluoroacético en acetonitrilo (1:2 v/v) [5]. Una vez terminada la reacción, se inyectaron 100 µL de la solución al sistema cromatográfico.

Condiciones cromatográficas. La fase móvil estuvo compuesta por ácido acético (0,2% en agua), metanol y acetonitrilo (4:32:64 v/v/v) y se bombeó a una frecuencia de flujo de 1,5 mL/min a través de una columna Supelcosil C 18 (5µm; 15 x 0,46 cm, Supelco®, EUA). Se empleó un sistema de detección por fluorescencia a una longitud de onda de excitación 383 nm y 447 de emisión (detector RF-10AXL, Shimadzu, Japon).

Validación de la metodología analítica

La validación de la metodología analítica para la determinación de ivermectina en tejidos se realizó según los procedimientos descritos por la Agencia europea para la evaluación de productos medicinales (EMA)[6], Food and Agriculture Organization (FAO) [9] y Shah y col. [21], en muestras en triplicado en las que se determinó la especificidad, precisión, exactitud, recuperación, linealidad intradía e interdía, límite de detección y límite de cuantificación.

Para la determinación de la **especificidad** se compararon los cromatogramas de muestras de tejidos libres de fármaco con los de muestras sobrecargadas con ivermectina (externos), así se estableció la presencia o ausencia de impurezas en el tiempo de retención de la ivermectina.

La **“precisión”** se expresó como el coeficiente de variación de los resultados obtenidos en diferentes días (preci-

sión intradía) y los análisis realizados en un mismo día (precisión interdía). Se expresó como coeficiente de variación (CV%) de los resultados del análisis de las muestras.

La **“exactitud”** se expresó como el error medio de la diferencia entre el valor observado y el real, dividido por el valor observado, expresado en porcentaje.

La **“recuperación”** se determinó estableciendo la relación entre las áreas de los picos cromatográficos existentes en las muestras de tejido sobrecargado con las concentraciones conocidas de ivermectina y las obtenidas de la inyección directa del estándar puro disuelto en acetonitrilo. Los resultados se expresaron en porcentaje.

La **“linealidad” intradía e interdía** se determinó mediante la inyección de muestras de tejidos sobrecargadas con concentraciones crecientes de ivermectina en triplicado en los 4 tejidos del estudio. Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis de regresión de mínimos cuadrados, representando las concentraciones de fármaco en el eje de las abscisas y el área de los picos cromatográficos en la ordenada. La linealidad se expresó mediante la ecuación de la recta $y=ax + b$,

donde:

y = es la respuesta del detector expresada en área o relación de área

a = es la pendiente de la curva de calibración

x = es la concentración de analito en la muestra

b = es el intercepto de la curva de calibración

Los Límites de detección y de cuantificación para cada tejido se determinaron a partir de 10 inyecciones repetidas de muestras blanco libres de fármaco, cuantificándose el promedio del ruido en la línea base correspondiente al tiempo de retención de IVM. El límite de detección se definió como el promedio del ruido de la línea base más 3 desviaciones estándar [6]. El límite de cuantificación se calculó a partir del promedio del ruido de la línea base más 10 desviaciones estándar [6].

Estudio de depleción de residuos de ivermectina en tejidos de ovinos tratados por vía subcutánea

Con el propósito de evaluar la persistencia de las concentraciones titulares de ivermectina en ovinos tratados por vía subcutánea, se utilizaron 12 corderos de raza Suffolk down de aproximadamente 3 meses de edad y con un peso promedio de $18,2 \pm 0,7$ kg. Previo al ensayo los animales fueron tratados con tres dosis de 5 mg/Kg de fenbendazol cada 21 días por un período de 70 días para asegurar su condición de animales sanos libres de parásitos; transcurrido este período, los animales alcanzaron un peso de promedio de $27,8 \pm 1,3$ kg y fueron tratados con 0,2 mg/kg de ivermectina vía subcutánea y luego fueron sacrificados grupos de 3 animales cada uno a los 1,5; 7; 14 y 21 días post tratamiento. Se obtuvieron muestras de hígado, riñón, músculo y grasa las que fueron almacenadas a -18°C hasta su procesamiento. Las muestras obtenidas de

los tejidos fueron sometidas a procesos de extracción en fase sólida según metodología descrita por Lifschitz y col. [15], luego fueron analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Análisis Farmacocinético. Los parámetros farmacocinéticos de tiempo medio de eliminación del fármaco ($t_{1/2\beta}$) y tiempo medio de residencia (TMR) fueron calculados mediante análisis farmacocinética no compartimental utilizando el programa PK Solutions [8].

Análisis estadístico. Los parámetros estadísticos: promedio, desviación estándar (D.E.), coeficiente de variación (C.V.) y error medio (E.M.) se calcularon mediante métodos estadísticos convencionales [23].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Validación de la Metodología analítica

La validación de toda metodología analítica implica una serie de procedimientos capaces de medir, determinar y demostrar que el protocolo definido para una determinada técnica pueda aplicarse como base o referencia para el análisis de muestras en el laboratorio [16]. La validación es necesaria cada vez que se utiliza un nuevo método y siempre involucra un procedimiento analítico en particular que permita obtener resultados confiables y reproducibles [21].

Existen diversos procedimientos analíticos para detectar IVM desde una matriz biológica mediante HPLC [5] pero estas técnicas de detección incluyen una complicada preparación de las muestras que implica gran cantidad de tiempo en su elaboración [10].

Los porcentajes de recuperación para cada punto de la escala considerados en la recta de calibración para los tejidos analizados se presentan en la TABLA I. Con los procedimientos de extracción en fase sólida de IVM en los diferentes tejidos analizados en el presente estudio, empleando la metodología descrita por Lifschitz y col. [15], fue posible obtener extractos limpios con porcentajes de recuperación adecuados que fluctuaron entre 79 y 84% en hígado, 77 a 80,7% en riñón,

78 a 79,5% en músculo y 70 a 93,2% en tejido graso, valores que están dentro de los rangos descritos por las agencias internacionales encargadas de establecer las exigencias de los procedimientos analíticos para la detección de residuos de fármacos en tejidos comestibles [6,9].

La especificidad, definida como la capacidad del método para reconocer el analito en presencia de otros componentes fue demostrada a través del empleo de los cromatogramas de muestras blanco para cada tejido analizado libre del fármaco, asegurándose de no obtener interferencias en el tiempo de retención de IVM, lo que sugiere una buena especificidad del método [6,9]. La especificidad para los tejidos considerados en el estudio se presentan en la FIG. 1. La FIG. 1A muestran cromatogramas correspondientes a los tejidos (hígado, riñón, músculo y grasa) libres de fármaco. La FIG. 1B muestran los cromatogramas de solución estándar de IVM (25 ng). Las muestras de los tejidos blanco sobrecargadas con IVM se muestran en la FIG 1C. La simetría de los picos cromatográficos para el estándar de 25 ng/g de IVM en hígado, riñón y músculo, como también para el estándar de 50 ng/g de IVM en grasa, demuestran la adecuada especificidad del método analítico.

La TABLA II muestra los resultados de linealidad intradía y linealidad interdía obtenidos en los diferentes tejidos analizados. La ecuación de la recta de regresión que describe la relación entre concentración de fármaco y las áreas cromatográficas intradía está representada por $y = 104218x - 8612,6$ para hígado, $y = 107898,3x + 1003,1$ para riñón, $y = 118457x - 623,3$ para músculo e $y = 9993,2x - 12372,53$ para grasa; donde "x" es la concentración de IVM (ng/g), "a" la pendiente y "b" el intercepto. La relación entre concentración de fármaco y las áreas cromatográficas interdía está representada por $y = 91471,1x + 15432,8$ para hígado, $y = 114246,7x - 7583,4$ para riñón, $y = 124699x - 1523,8$ para músculo, $y = 10997,3x - 20309,5$ para grasa. El coeficiente de correlación fue siempre mayor o igual a 0,995 en ambos parámetros, lo que indica que existe una relación proporcional entre la respuesta del detector y la concentración del analito permitiendo así cuantificar en forma confiable las concentraciones de IVM en las muestras problemas [15]. El coeficiente de variación intradía para hígado, riñón, músculo y grasa respectivamente, fue 3,1; 10,1; 7,99 y 1,99%,

TABLA I

PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN EN TEJIDOS DE OVINOS SOBRECARGADOS CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE IVERMECTINA / PERCENTAGES OF RECOVERY IN OVINE TISSUES FORTIFIED WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF IVERMECTIN

Concentración (ng/g)	Hígado		Riñón		Músculo		Tejido Adiposo	
	Prom. %	CV %	Prom. %	CV %	Prom. %	CV %	Prom. %	CV %
1	84,50	11,14	79,03	8,66	79,52	8,54		
5	79,52	8,48	77,70	6,93	78,61	6,47	93,21	8,71
10	79,08	3,47	80,78	14,23	78,04	4,05	92,17	4,14
25	82,78	2,80	77,27	5,42	79,12	3,48	70,97	5,25
50	81,46	5,54	77,53	7,12	79,14	5,08	75,87	8,07
100							74,78	8,41
200							74,49	4,75

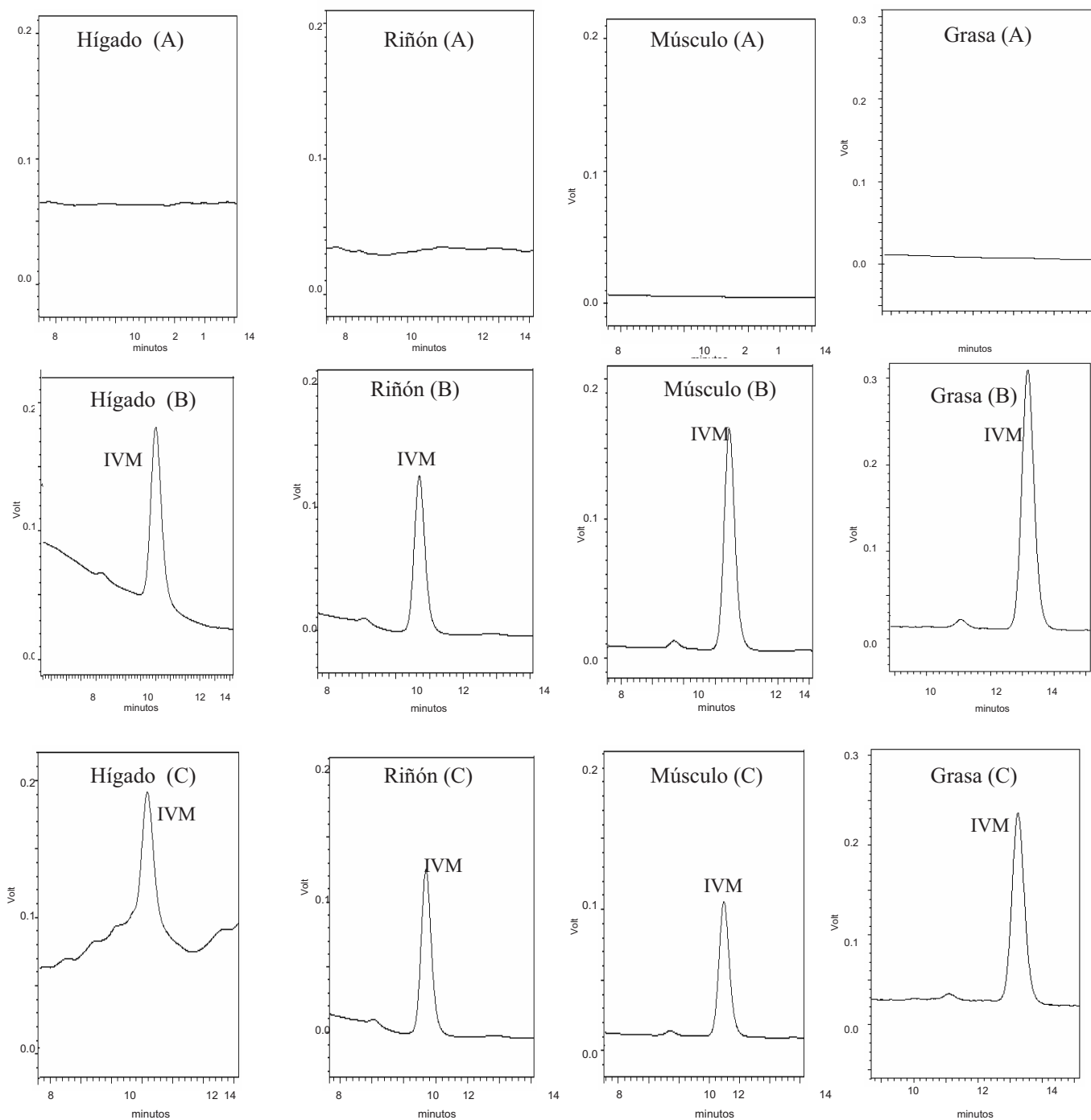


FIGURA 1. CROMATOGRAMAS REPRESENTATIVOS DE IVM EN HIGADO, RIÑÓN, MUSCULO Y TEJIDO GRASO DE OVINO. A) MUESTRAS BLANCO DE TEJIDO LIBRE DE FÁRMACO. B) ESTÁNDAR DE IVM (25 ng). C) MUESTRAS DE TEJIDOS SOBRECARGADAS CON 25 ng/g DE IVM. / TYPICAL CHROMATOGRAMS OF IVM IN SHEEP TISSUES (LIVER, KIDNEY, MUSCLE AND FAT). A) DRUG FREE TISSUES SAMPLES. B) STANDARD OF IVM (25 ng). C) TISSUES SAMPLES FORTIFIED WITH 25 ng/g OF IVM.

en tanto el coeficiente de variación interdía fue 9,2; 10,3; 3,9 y 2,8%, siendo éstos inferiores a los establecidos por EMEA y FAO [6,9] para la validación de métodos analíticos oficiales.

La validación de la metodología analítica se realizó siguiendo las recomendaciones de la EMEA [6] y FAO [9], aceptándose valores de precisión y exactitud definidas por el Coefi-

ciente de variación (CV%) y el error medio iguales o menores al 15% [21]. Los promedios de los valores calculados de precisión y exactitud intra e interdía (n=6) se muestran en la TABLA II. En el presente estudio los valores de precisión fluctuaron entre 2,36 a 3,58% y los de exactitud entre 0,69 a 4,22% en todos los tejidos analizados, siendo todos inferiores a lo es-

TABLA II
PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE IVERMECTINA EN TEJIDOS DE OVINOS / ANALYTICAL METHODOLOGY VALIDATION PARAMETERS FOR THE DETERMINATION OF IVERMECTIN IN SHEEP TISSUES.

	Hígado	Tejido adiposo	Riñón	Músculo
Parámetros de validación	promedio (rango)	promedio (rango)	promedio (rango)	promedio (rango)
Linealidad intradía (r^2)	0,998 (0,997-0,998)	0,999 (0,9990-0,9997)	0,998 (0,995-0,999)	0,998 (0,997-0,999)
Linealidad interdía (r^2)	0,998 (0,995-0,9999)	0,998 (0,997-0,999)	0,999 (0,998-0,999)	0,999 (0,998-0,999)
Precisión (CV%)	3,35 (0,7-5,5)	2,36 (0,81-4,68)	3,58 (0,6-7,3)	2,51 (0,7-4,5)
Exactitud (EM%)	1,69 (0,48-4,25)	4,22 (1,5-10,22)	1,55 (0,31-3,43)	0,99 (0,37-1,61)
Límite de Detección (ng/g)	0,18	1,23	0,42	0,08
Límite de Cuantificación (ng/g)	0,48	2,65	1,02	0,18

tablecido por la EMEA [6] y Shah y col. [21], lo que sugiere que el método aplicado para la extracción de IVM tiene un alto grado de precisión. También los bajos valores de error medio obtenidos en la validación del método analítico en los tejidos analizados indican una estrecha cercanía entre los resultados obtenidos posterior a la extracción del analito y los valores teóricos, reflejando la adecuada exactitud del método. Los parámetros de validación obtenidos mediante el protocolo descrito, demuestran que el método es preciso y confiable para la detección y cuantificación de residuos de IVM en tejidos.

El límite de detección, definido como la mínima concentración de analito que puede detectar el método con razonable certeza estadística fue de 0,18 ng/g para hígado; 0,42 ng/g en riñón; 0,08 ng/g para músculo y 1,23 ng/g en tejido adiposo. El límite de cuantificación, definido como la menor concentración del analito que puede determinarse cuantitativamente con un nivel aceptable de repetibilidad y precisión se estableció en 0,48 ng/g para hígado; 1,02 ng/g para riñón; 0,18 ng/g para músculo y 2,65 ng/g para tejido adiposo.

Estudio de residuos de IVM en tejidos

Los promedios de las concentraciones de IVM en hígado, riñón, músculo y tejido adiposo de los ovinos utilizados para el estudio de residuos en los tiempos posterior a la administración de 0,2 mg/kg peso vivo se presentan en la TABLA III. Las mayores concentraciones de IVM se observaron en las muestras de hígado ($281,7 \pm 116,95$ ng/g) y tejido adiposo ($248,7 \pm 90,9$ ng/g) a los 1,5 días posterior a la administración vía subcutánea. Los promedios de las concentraciones de IVM en hígado observadas a los 7 días posterior a la administración subcutánea del fármaco son mayores a los descritos por Chiu y col. [4], en ovinos tratados con una dosis de 0,3 mg/kg vía intraruminal quienes obtuvieron concentraciones de 11 ± 3 ng/g, mientras que las concentraciones obtenidas en el

presente estudio a los 7 días fueron de $56,4 \pm 26,05$ ng/g. Las altas concentraciones de IVM observadas en hígado se atribuyen a que el fármaco una vez absorbido, se distribuye en la circulación sanguínea y es metabolizado y biotransformado principalmente en este tejido [4, 19].

Las concentraciones de IVM en el tejido adiposo también son mayores a las encontradas por Chiu y col. [4], a los 7 días post administración de IVM en ovinos por vía intraruminal quienes describen promedios de $32,0 \pm 7,6$ ng/g de IVM que son menores a los $122,4 \pm 49,6$ ng/g obtenidos en los ovinos del presente estudio, lo que indica que la administración por vía subcutánea permite una mayor absorción del fármaco que la vía intraruminal, debido a que cuando se administra por vía digestiva, el fármaco se adhiere fuertemente a las partículas de alimento lo que disminuye su absorción [19]. También la mayor biodisponibilidad del fármaco luego de la administración subcutánea va a permitir que se excreten altas concentraciones por la bilis para luego ser recaptado hacia la circulación sistémica para distribuirse nuevamente a los tejidos lo que prolonga su persistencia en el organismo [12].

En bovinos tratados con una dosis de 0,3 mg/kg IVM por vía subcutánea se describen concentraciones de $622,0 \pm 223,0$ ng/g en hígado y $220,0 \pm 58,0$ ng/g en grasa a los 7 días post administración [4], concentraciones que son superiores a las encontradas en el presente estudio. Estas diferencias se atribuyen a la mayor dosis utilizada y a las diferencias en la distribución de la grasa corporal entre ambas especies.

De los tejidos analizados en el presente estudio, el tejido adiposo es el que presenta una mayor persistencia de las concentraciones de IVM a través del tiempo, resultados que concuerdan con los descritos por Lifschitz y col. [15], para moxidectina administrada vía subcutánea en ovinos, quienes describen que en todos los tiempos posterior a la administración del fármaco las mayores concentraciones se obtienen en el te-

TABLA III
CONCENTRACIONES DE IVERMECTINA EN TEJIDOS DE OVINOS TRATADOS POR VÍA SUBCUTÁNEA
EN LOS DIFERENTES TIEMPOS DE MUESTREO / IVERMECTIN CONCENTRATIONS IN EDIBLE TISSUES OF SHEEP TREATED
BY SUBCUTANEUS ROUTE AND SAMPLED AT DIFFERENT SAMPLING TIMES.

	Hígado	Tejido adiposo	Riñón	Músculo
Tiempo (días)	IVM (ng/g)	IVM (ng/g)	IVM (ng/g)	IVM (ng/g)
1.5	281,7 ± 117,0	249,0 ± 91,0	96,1 ± 44,1	66,1 ± 7,0
7	56,4 ± 26,1	122,4 ± 50,0	18,0 ± 4,8	27,0 ± 16
14	11 ± 6,5	20,0 ± 11,2	2,0 ± 1,4	1,3 ± 1,0
21	0,6 ± 0,2	4,1 ± 2,3	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1

jido adiposo. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la TABLA IV, el mayor TMR se observó en el tejido adiposo y fue de $5,2 \pm 0,3$ días; seguidos de riñón ($3,7 \pm 1$ días), hígado ($3,7 \pm 0,4$) y músculo ($1,2 \pm 0,7$ días). Los valores de tiempo medio de eliminación fueron de $2,0 \pm 0,2$ días para hígado; $3,0 \pm 0,7$ días para riñón; $1,5 \pm 0,3$ días para músculo y $5,4 \pm 2$ días para tejido adiposo indicando con ello que es el tejido donde el fármaco permanece por más tiempo.

Estos resultados demuestran que la alta lipofiliidad que presentan las lactonas macrocíclicas les permiten una gran afinidad por el tejido adiposo que actúa como depósito de fármaco y va a facilitar su mayor persistencia en el organismo [25]. Esto se refleja en el prolongado tiempo medio de residencia observado en el tejido adiposo que es de $5,2 \pm 0,27$ días y que se relaciona al tiempo medio de eliminación del fármaco en este tejido que es de $5,4 \pm 2$ días, superior a lo encontrado en los otros tejidos analizados en el presente estudio. Los promedios de estos parámetros son menores a los descritos por Chiu y col. [3], quienes observaron un tiempo medio de eliminación del fármaco de 4,8 días en hígado y 7,6 días en tejido adiposo de bovino tratado por vía subcutánea. En cambio en ovinos tratados con IVM vía intraruminal por los mismos autores [3], los promedios son inferiores a los resultados observados en el presente estudio, lo que permite destacar la influencia de la especie y de la vía de administración sobre la distribución y persistencia del fármaco en los tejidos.

TABLA IV
VIDA MEDIA DE ELIMINACIÓN Y TIEMPO MEDIO DE
RESIDENCIA DE IVERMECTINA EN TEJIDOS DE OVINOS
TRATADOS POR VÍA SUBCUTÁNEA (PROMEDIO ± EE) /
HALF LIFE OF ELIMINATION AND MEAN RESIDENCE TIME OF IVM IN
TISSUES OF SHEEP TREATED BY SUBCUTANEOUS ROUTE.

	$t_{1/2\beta}$ (días)	TMR (días)
Hígado	$2,0 \pm 0,2$	$3,7 \pm 0,4$
Riñón	$3,0 \pm 0,7$	$3,7 \pm 1,0$
Músculo	$1,5 \pm 0,29$	$1,2 \pm 0,7$
Tejido adiposo	$5,4 \pm 2,0$	$5,2 \pm 0,27$

$t_{1/2\beta}$: tiempo medio de eliminación; TMR: tiempo medio de residencia.

Las menores concentraciones tisulares de IVM observadas en el presente estudio se encontraron en las muestras de músculo y riñón, resultados que son similares a los obtenidos por Chiu y col. [4], en tejidos de ovinos, donde las concentraciones de IVM son muy pequeñas ya a los 14 días post tratamiento. Las bajas concentraciones de IVM encontradas en riñón indica que la vía urinaria no representa una ruta importante para la eliminación del fármaco, ya que como ha sido descrito, sólo un 2% de la dosis administrada se excreta por vía urinaria [3].

La determinación de las concentraciones residuales de un fármaco en los tejidos comestibles provenientes de animales tratados, es de preocupación frecuente para la seguridad de los alimentos destinados a consumo humano, por lo que las agencias internacionales establecen un límite máximo de residuos (LMR) que sirve como base para calcular los periodos de resguardo en carnes y tejidos comestibles [7].

Tomando como referencia el límite máximo de residuos (LMR) establecido para IVM por la EMEA [7], de $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ para hígado y tejido adiposo, los promedios de las concentraciones de IVM encontradas en las muestra de hígado de los animales del presente estudio sobrepasan el LMR establecido sólo en el muestreo realizado a los 1,5 días post tratamiento. Al comparar las concentraciones promedio de IVM en el tejido adiposo se observa que éstas son superiores al LMR hasta los 7 días postadministración, lo que demuestra que el fármaco se concentra y permanece por mayor tiempo en este tejido [25], por lo que se debe considerar como el tejido diana para el cálculo del periodo de resguardo.

CONCLUSIONES

El método analítico validado en el presente estudio presenta resultados de sensibilidad, especificidad, recuperación, precisión y exactitud adecuados que permiten obtener resultados seguros y confiables para la detección y cuantificación de residuos de ivermectina en tejidos de ovinos.

Las mayores concentraciones de residuos de IVM en tejidos se observaron en hígado y tejido adiposo, en cambio el músculo es el tejido que presenta las menores concentraciones del fármaco.

AGRADECIMIENTO

Financiado por: Proyecto FONDECYT 1030609

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ATTA, A.; ABO-SHIHADA, M. Comparative pharmacokinetics of doramectin and ivermectin in sheep. **J. Vet. Pharm. Therap.** 23:49-52. 2000.
- [2] CAMPBELL, W.C. FISHER, M.H.; STAPLEY, E.O.; ALBERS-SCHÖNBERG, G.; JACOB, TA. Ivermectin: A potent new antiparasitic agent. **Sci.** 221: 823-828. 1983.
- [3] CHIU, SH.; LU, A. Metabolism and Tissue Residues. Cap. 8. En: W.C. Campbell (Ed.). **Ivermectin and Abamectin**. Merck Institute for Therapeutic Research, N.Y. 131-143 pp. 1989.
- [4] CHIU, SH.; LU, A.; GREEN, M.; BAYLIS, F.; ELINE, D.; ROSEGAY, A.; MERIWETHER, H.; JACOB, T. Absorption, tissue distribution and excretion of Tritium-labeled ivermectin in cattle, sheep, and rat. **J. Agric. Food Chem.** 38:2072-2078. 1990.
- [5] DE MONTIGNY, P.; SHIM, J.; PIVNICHNY, J. Liquid chromatographic determination of ivermectin in animal plasma with trifluoroacetic anhydride and N- methylimidazole as the derivatization reagent. **J. Pharmac. Biomed. Anal.** 8:507-511. 1990.
- [6] EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMA). Guideline on validation of analytical procedures: Methodology. VICH. topic GL2. 1-7 pp. 1998.
- [7] EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMA). Committee for veterinary medicinal products. Ivermectin. Summary report N° 5. 1-3 pp. 2004.
- [8] FARRIER, D.S. PK solutions. Non Compartmental pharmacokinetics data analysis. User guide. Summit Research Services. Ashland, Oh, 50 pp. 1997.
- [9] FISCHER, J.; NELLY, MT.; SMYTH, MR.; JANDERA, P. Determination of ivermectin in bovine plasma by column-switching LC using on-line-phase extraction and trace enrichment. **J. Pharm. Biom. Analysis.** 11:217-223. 1993.
- [10] FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). Establecimiento de programas reglamentarios. Consideraciones generales sobre los métodos de análisis para el control de residuos. En: *Codex alimentarius*. Volumen 3. Residuos de Medicamentos Veterinarios en los alimentos. 60-76 pp. 1995.
- [11] GEARY, T.G.; SIMS, SM.; THOMAS, EM.; VANOVER, L.; DAVIS, JP.; WINTERROWD, CA.; KLEIN, RD.; HON, F.; THOMPSON, D. Haemonchus contortus: Ivermectin-induced paralysis of the pharynx. **Exp. Parasitol.** 77:88-96. 1993.
- [12] HENNESSY, D.; PAGE, S.; GOTTSCHALL, D. The behaviour of doramectin in the gastrointestinal tract, its secretion in bile and pharmacokinetic disposition in the peripheral circulation after oral and intravenous administration to sheep. **J. Vet. Pharm. Therap.** 23: 203-213. 2000.
- [13] LANUSSE, C.E. Factores que afectan la biodisponibilidad plasmática y eficacia de fármacos antihelmínticos. **Arch. Med. Vet.** 26:5-13. 1994.
- [14] LESPINE, A.; ALVINIERIE, M.; SUTRA, J.F.; PORS, I.; CHATIER, C. Influence of the route of administration on efficacy and tissue distribution of ivermectin in goat. **Vet. Parasitol.** 128:251-260. 2005.
- [15] LIFSCHITZ, A.; IMPERIALE, F.; VIRKEL, G.; MUÑOZ, M.; SCHERLING, N.; DELAY, R.; LANUSSE, C. Depletion of moxidectin tissue residues in sheep. **J. Agric. Food Chem.** 48:6011-6015. 2000.
- [16] LINDHOLM, J.; JOHANSSON, M.; FORNSTEDT, T. Guidelines for analytical method development and validation of biotechnological synthesis of drugs. Production of a hydroxyprogesterone as model. **J. Chromatogr. B.** 791: 323-336. 2003.
- [17] MÁRQUEZ, D. Resistencia a los antihelmínticos, origen, desarrollo y control. **Rev. Corpoica** 4:55-71. 2003.
- [18] MARTIN, R.J. Review. Modes of actions of Anthelmintics Drugs. **Vet. J.** 154:11-34. 1997.
- [19] MC KELLAR, Q.; BENCHAOUI, H. Avermectin and milbemicyns. **J. Vet. Pharm Therap.** 19:331-351. 1996.
- [20] PRIETO, J.; MERINO, G.; PULIDO, M.; ESTÉVEZ, E.; MOLINA, A.; VILA, L.; ALVAREZ, A. Improved LC method to determine ivermectin in plasma. **J. Pharmac. Biom. Anal.** 31:639-645. 2003.
- [21] SHAH, V.; MIDHA, K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I.; SKELLY, J.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C.; COOK, C.; MCDOWALL, R.; PITTMAN, K.; SPECTOR, S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies. **J. Pharm. Sci.** 81(3):309-312. 1992.
- [22] SHOOP, W.; MROZIK, H.; FISHER, M. Structure and activity of avermectins and milbemicyns in animal health. **Vet. Parasitol.** 59:139-156. 1995.
- [23] TAUCHER, E. Medidas de resumen. En: Taucher, E.(Ed.). **Bioestadística**. 2ª Ed. Editorial Universitaria, Santiago, 65-76 pp. 1999.
- [24] TAVERNIERS, I.; DE LOOSE, M.; VAN BOCKSTAELE, E. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Ana-

- lytical method validation and quality assurance. **Trends in Anal. Chem.** 23:535-552. 2004.
- [25] TWAY, P.; WOOD, J.; DOWNING, G. Determination of ivermectin in cattle and sheep tissues using High Performance Liquid chromatography with fluorescence detection. **J. Agric. Food. Chem.** 29:1059-1063. 1981.
- [26] WICKS, S.R.; KAYE, B.; WEATHERLEY, A.J.; LEWIS, D.; DAVISON, E.; GIBSON, S.P.; SMITH, D.G. Effect of formulation on the pharmacokinetics and efficacy of doramectin. **Vet. Parasitol.** 49: 17-26. 1993.