

DESCRIPCIÓN DEL INVENTO

El control actual de ectoparásitos o parásitos externos en los animales ha cambiado debido a múltiples factores, entre ellos la resistencia de los parásitos a los insecticidas, que es uno de los más importantes.

Una estrategia y tendencia de la industria farmacéutica a nivel mundial para evitar fallas en el control de estos ectoparásitos es utilizar un compuesto que sea de reciente síntesis, que actúe de manera rápida, posea buen efecto residual sobre el animal, tenga amplio espectro y que los efectos tóxicos sobre animales, humanos y ambiente sean mínimos o nulos.

Siguiendo estas tendencias, **ICOFARMA SA.**, desarrolla el primer insecticida pecuario a base de Fipronil acompañado de Butóxido de Piperonilo. Esta mezcla maximiza la duración del efecto insecticida del fipronil y contrarresta la resistencia parasitaria; dicha afirmación fue corroborada en el estudio realizado por Dr. Efraín Benavides⁴, en un estudio in vitro y en campo realizado en perros y gatos.

El **fipronil** (fenilpirazol) fue descubierto y desarrollado por Rhône-Poulenc entre 1985 y 1987, y se coloca en el mercado en 1993 bajo el N° Patente US 5.232.940 B2. Entre 1987 y 1996, el fipronil se evaluó en más de 250 plagas de insectos en 60 cultivos en todo el mundo, y la protección de los cultivos representó alrededor del 39% de la producción total fipronil en 1997. Desde 2003, BASF (*Badische Anilin- und Soda-Fabrik*, empresa química alemana) tiene los derechos de patente para la producción y venta de productos a base de fipronil en muchos países. El fipronil es el principal ingrediente activo de la primera línea de spot on; estos tratamientos se utilizan en la lucha contra garrapatas, piojos y pulgas.^{1; 2.}

El **Fipronil** es un *fenil pirazol* que se introdujo en la medicina veterinaria a mediados de la década de 1990 en forma de un aerosol de alcohol para uso en perros y gatos. Hoy día en el mercado mundial existen diferentes insecticidas pecuarios a base de fipronil, indicado en diversas especies animales domésticas.

El **Fipronil**, actúa por ingestión o por contacto, es un insecticida sistémico que produce la inhibición de los canales de Cloro activados por el Ácido Gamma Amino Butírico (GABA), bloqueando la acción de los receptores de GABA en Sistema Nervioso Central del parásito.

Hoy día existen en el mercado mundial diferentes presentaciones comerciales a base de **fipronil**, para el control y tratamiento de ectoparásitos en animales domésticos. Desafortunadamente, el uso ilógico e irracional de este insecticida, al ser subdosificado, al no ser aplicado en los períodos recomendados de aplicación, ha llevado con el pasar del tiempo a la presentación de resistencia parasitaria a este activo; ya que los parásitos a pesar de contar con organismos “*primitivos*” versus los mamíferos, poseen una genética más evolucionada, que gracias a sus ciclos de vida tan cortos, en comparación

a un mamífero, permiten que su genética se adapte a las agresiones que generan a sus organismos los insecticidas, y empiecen a adaptarse a la presencia de éstos, dando como resultado una resistencia parasitaria en este caso al **fipronil**.

En el correr de los años, la ciencia ha desarrollado mezclas de diversos insecticidas con el propósito de contrarrestar la resistencia al uso indiscriminado de insecticidas. Durante este proceso, se han implementado potencializadores en algunos insecticidas, tal como los piretroides, insecticidas que actúan en el metabolismo de los parásitos (en la bomba de sodio y potasio). Los piretroides, al ser acompañados en su formulación por un potencializador o sinergista, han permitido contrarrestar los efectos no deseados de la resistencia parasitaria por el uso indiscriminado de piretroides. Uno de los potencializadores utilizado por la industria es el **Butóxido de Piperonilo** (PBO) el cual es un sinérgico de insecticidas. Por sí mismo no tiene propiedades insecticidas, sin embargo, cuando se añade a compuestos insecticidas, tales como los piretroides, la potencia de estos químicos es incrementada considerablemente. El **Butóxido de Piperonilo** es el sinérgico más usado en la actualidad. Su descubrimiento data de mediados de la década de 1940 en Estados Unidos de América. La función de los sinérgicos es inhibir las enzimas oxidativas que degradan los compuestos insecticidas. De esta manera, las materias activas insecticidas permanecen más tiempo en el organismo a eliminar³.

El **Butóxido de Piperonilo** actúa inhibiendo los mecanismos de detoxificación permitiendo que las concentraciones del insecticida sean mayores dentro del organismo del parásito, impidiendo su metabolización y su permanencia dentro del parásito sea mayor gracias al **Butóxido de Piperonilo**.

La mezcla de **Fipronil** con **Butóxido de Piperonilo** nunca ha sido reportada para uso pecuario, y dada la problemática presentada por el uso indiscriminado e inadecuado de insecticidas pecuarios, **ICOFARMA S.A.** realizó investigaciones técnicas y de mercadeo de la tendencia de los insecticidas pecuarios, apoyado en profesionales de la Química Farmacéutica, la Medicina Veterinaria, y especialistas en análisis de tendencias de los mercados, a cargo de un experimentado Departamento de Mercadeo, y en pro del avance de la investigación, la ciencia y la industria nacional desarrolló un insecticida pecuario a base de un insecticida, más un potencializador, nunca antes utilizado en el sector pecuario, dando como resultado un insecticida de uso pecuario a base de **Fipronil y Butóxido de piperonilo** (PBO) para el control y tratamiento de ectoparásitos (pulgas, pijos y garrapatas) en animales domésticos.

Para elaborar dicho insecticida, fue necesario desarrollar un proceso y protocolo estandarizado de fabricación en laboratorio, al cual se le desarrollaron unas pruebas de estabilidad que garanticen la inocuidad de la mezcla, así como unas pruebas toxicológicas que garanticen que su uso es seguro en las especies para las cuales se indica su uso.

El Protocolo de Fabricación de la mezcla es el siguiente:

BATCH ESTANDAR: 50 Litros

FORMULA:

Principios Activos

Fipronil	5000 g
Butóxido de Piperonilo	750 g

Excipientes:

2- Pirrolidona (Soluphor)	11000 g
Galato Propilo	25 g
Glicerol formal c.s.p.	50 L

PROCEDIMIENTO:

1. Alistamiento de áreas y equipos (Balanzas, tanque, Agitador, utensilios) de conformidad con las B.P.M.
2. Para la elaboración del producto, los operarios deben disponer de guantes y máscaras apropiadas.
3. Determinación del volumen del lote a fabricar y de acuerdo con este realizar la dispensación y pesaje correspondiente de cada uno de los ingredientes de la formulación.
4. Adicionar en el tanque de fabricación el Glicerol formal, agitar hasta completa disolución.
5. Adicionar el Galato de Propilo en el tanque de fabricación, agitar hasta completa disolución.
6. En un tanque con capacidad adecuada agregar la 2- Pirrolidona (Soluphor) y calentar hasta que este líquida, adicionarla lentamente al tanque de preparación, agitar hasta completa incorporación.
7. Adicionar al tanque de preparación lentamente y con agitación constante el Fipronil hasta observar completa disolución.
8. Adicionar al tanque de preparación lentamente y con agitación constante el Butóxido de Piperonilo hasta observar completa disolución.
9. Completar a volumen con el Glicerol Formal, agitar hasta observar completa homogenización.
10. Tomar muestra para el análisis químico, una vez aprobado por control de calidad filtrar el producto por un filtro esterilizante y envasar en las diferentes presentaciones según la orden de producción.
11. Una vez liberados por parte de control de calidad realizar el acondicionamiento del producto según la orden de producción.

Se practicaron los siguientes estudios de laboratorio para validar la mezcla. Cabe aclarar que, dentro de los anexos, la mezcla de **Fipronil** con **Butóxido de Piperonilo** es denominada "**PET PROTECTION**"

Los **Resultados del Estudio de Estabilidad** de la mezcla se encuentran en el **ANEXO 01**.

Los **Resultados de los Estudios Toxicológicos** de la mezcla se encuentran en los **ANEXOS 02 al 08**. Los anteriores anexos están respaldados por el **CONCEPTO TOXICOLÓGICO MP-14365-2010 emitido por La Dirección General de Salud Pública del Ministerio de la Protección Social de la República de Colombia**, y se soporta con los **ANEXOS 09 y 10**.

DESCRIPCIÓN DE ANEXOS:

- 02 Anexo Toxicidad Oral Aguda
- 03 Anexo Toxicidad Dérmica Aguda
- 04 Anexo Toxicidad Inhalatoria Aguda
- 05 Anexo Irritación Dérmica Aguda
- 06 Anexo Irritación Ocular Aguda
- 07 Anexo Sensibilización Dérmica
- 08 Anexo Informe Histopatológico
- 09 Anexo Dictamen Toxicológico
- 10 Anexo Concepto Toxicológico MP-14365-2010

De igual forma fue necesario realizar unas pruebas de laboratorio y de campo, con el fin de **Validar la Eficacia Insecticida de una Mezcla de Fipronil y Butóxido de Piperonilo (PBO) para el Control y Tratamiento de ectoparásitos en animales domésticos**, para lo cual se realizó un convenio de investigación con la academia, apoyados con la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de La Salle, para demostrar no solo químicamente, sino médicamente que la mezcla de **Fipronil y Butóxido de piperonilo (PBO)**, es viable, segura y exitosa. Dicha investigación fue liderada, realizada y supervisada por el Dr. Efraín Benavides Ortíz, Médico Veterinario, MSc., PhD. Profesor asociado de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de La Salle, y es el Director Centro de Investigación en Medicina y Reproducción Animal, CIMRA; dicho investigador es un entomólogo y parasitólogo muy reconocido en la industria farmacéutica veterinaria. Los resultados obtenidos en dicho estudio son exitosos, ***“encontrando que esta mezcla es más eficaz que el fipronil solo, verificando así el efecto benéfico del sinergista como potencializador de la actividad insecticida”***. Este estudio fue realizado en mascotas (perros y gatos) en el control de pulgas.

Al evaluar mediante una prueba *in vitro*, utilizando la fase no parasítica de la pulga, el efecto insecticida del fipronil solo y en combinación con PBO, se encontró que con la mezcla de fipronil más PBO se necesitan dosis letales (DE50 – DE90) menores que con el fipronil solo, y que las preparaciones individuales tienen un comportamiento diferente en el caso del fipronil solo. Los resultados obtenidos en esta prueba son los siguientes:

Tabla 1. Dosis efectivas (DE50 y DE99) alcanzadas en los bioensayos, evaluando Fipronil o Fipronil + PBO.

No. bioensayo	Molécula	DE ₅₀	DE ₉₀
5	Fipronil	3.291	28.773
6	Fipronil+PBO	1.027	6.247
7	Fipronil	0.108	4.082
8	Fipronil+PBO	0.169	6.148
9	Fipronil	0.286	22.358
10	Fipronil+PBO	0.455	9.649
11	Fipronil	0.354	86.480
12	Fipronil+PBO	0.169	31.614
13	Fipronil	0.354	86.480
14	Fipronil+PBO	0.133	3.887
15	Fipronil+PBO	0.089	4.882
16	Fipronil	0.209	11.886
17	Fipronil+PBO	0.769	16.068
18	Fipronil+PBO	1.038	14.418
19	Fipronil+PBO	0.560	16.174
20	Fipronil	1.016	31.453
21	Fipronil	0.590	42.048
22	Fipronil	1.400	56.989

Los resultados de los bioensayos se analizaron utilizando el programa POLO-PC (Le Ora Software, 1987), en donde se tabularon los datos indicando la mortalidad en cada dilución, y el programa arrojó las dosis letales o dosis efectivas (DE50 y DE90) de cada bioensayo. En la tabla 9, se observan los resultados de las dosis efectivas 50 y 99 (DE50, DE99) alcanzadas en cada bioensayo, tanto para fipronil como para fipronil + PBO, lo cual fue calculado utilizando el programa POLO-PC, calculando los límites de confianza del 95% (LC95%).

Aparte, en campo se determinó la eficacia insecticida de la formulación a base de fipronil en combinación con PBO, y de una formulación que contenía únicamente fipronil para el control de pulgas *Ctenocephalides felis* en caninos y felinos, mediante un ensayo clínico doble ciego en hogares residenciales de la ciudad de Bogotá, donde se encontró que la mezcla con el PBO tuvo porcentajes de reducción en el conteo de pulgas mayores que con el fipronil solo. El estudio se realizó de la siguiente manera:

En total se incluyeron 30 pacientes con propietario, 23 caninos y 7 felinos, de varias localidades de la ciudad de Bogotá para realizar el estudio doble ciego y así determinar la eficacia de los medicamentos. Al asignar los tratamientos, 15 animales recibieron la pipeta con fipronil, 11 perros y 4 gatos, y 15 la pipeta con fipronil + PBO, 12 perros y 3 gatos. Cabe señalar que ningún paciente se retiró del estudio. De los caninos, el 39,1% (9/23) eran hembras y el 60,9% (14/23) fueron machos. Además, el 52,2% (12/23) de los pacientes caninos fueron de raza pura, entre estas Labrador, Bulldog, Pitbull, French

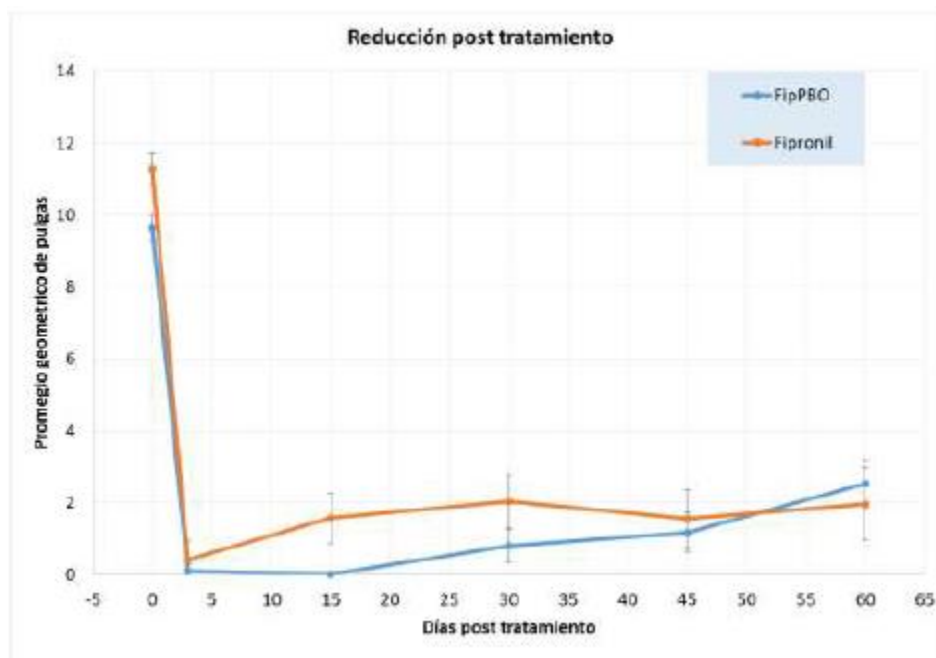
Poodle, Alaskan Malamute, Pekinés, Shih Tzu y Bull Terrier, y el 47,8% (11/23) restante fueron criollos o mestizos. De los felinos, el 42.9% (3/7) eran hembras y el 57.1% (4/7) fueron machos. El 14,3% (1/7) de los felinos fue de raza pura, correspondiente a Siamés, y el otro 85,7% (6/7) fueron criollos o mestizos. El promedio de edad de todos los pacientes fue de 6.28 años, con un rango entre 9 meses a 16 años. Otras características de los pacientes como el largo del pelo, las condiciones de vivienda, y el número de otros animales en el hogar se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Características demográficas de los pacientes del estudio doble ciego.

	Fipronil+PBO	Fipronil
Pelaje		
Corto	10 (66.6%)	11 (73.3%)
Largo	5 (33.3%)	4 (26.6%)
Tipo de vivienda		
Interior	13 (86.6%)	10 (66.6%)
Exterior	2 (13.3%)	5 (33.3%)
Otras mascotas en hogar		
0	2 (13.3%)	3 (20%)
1	5 (33.3%)	6 (40%)
2	6 (40%)	3 (20%)
3	2 (13.3%)	3 (20%)

Al estimar la densidad poblacional pre tratamiento, los conteos de pulgas en los pacientes individuales se encontraron entre 5 y 50 especímenes. Los promedios geométricos de los conteos de pulgas, con sus respectivos límites de confianza en cada fecha de recuento se presentan en la Figura 1:

Figura 1. Promedio geométrico de pulgas halladas por animal y límites de confianza del 95% en animales del ensayo doble ciego.



Los resultados del análisis de varianza y sus correspondientes valores de significancia (P) según la prueba de ANOVA realizada se presentan en la tabla 3; en ella se destacan con resaltador amarillo cuando se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0,05$) en los promedios.

Tabla 3. Promedios geométricos y análisis de varianza de los recuentos de pulgas de los pacientes del ensayo doble ciego.

Tratamiento	Día 0	Día 3	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60
Fipronil+PBO	9,64	0,097	0	0,803	1,178	2,53
Fipronil	11,28	0,407	1,58	2,03	1,56	1,96
Valor de F (P)	0,356 (0,555)	1,113 (0,300)	14,521 (0,001)	9,968 (0,004)	5,736 (0,024)	1.798 (0,1919)

Previo al tratamiento (día 0 del experimento) el promedio geométrico de pulgas fue respectivamente de 11,3 (LC95%= 7,7-16,4) y 9,6 (LC95%= 6,5-14,1) para los grupos Fipronil y Fipronil+PBO; las diferencias en el recuento entre grupos no fue significativa ($P= 0,555$), indicando que la comparación que sigue del efecto de los dos compuestos analizados mediante el estudio ciego, es pertinente En el día tres los promedios geométricos de ambos grupos, disminuyeron prácticamente a cero, siendo las diferencias no significativas.

Para el día 15 post tratamiento, aparecen importantes diferencias ($P= 0,001$) entre los promedios geométricos, siendo el recuento inferior en el grupo con sinergista, es decir, el compuesto Fipronil+PBO. Esta tendencia del mejor efecto del compuesto sinergizado se mantiene los días 30 ($P= 0,004$) y 45 ($P= 0,024$) de la evaluación, cuando los promedios geométricos de pulgas en ambos grupos se mantienen inferiores a un valor de 2,0 pulgas. En la evaluación de los 45 días post tratamiento los promedios geométricos fueron respectivamente para Fipronil y Fipronil+PBO de 3,4 pulgas ($LC95\%= 1,8-5,8$) y de 1,12 pulgas ($LC95\%= 0,4-2,3$). Para la última fecha de evaluación a los 60 días del tratamiento, la tendencia se invierte, pero las diferencias en los promedios entre los grupos no son significativas ($P= 0,1919$).

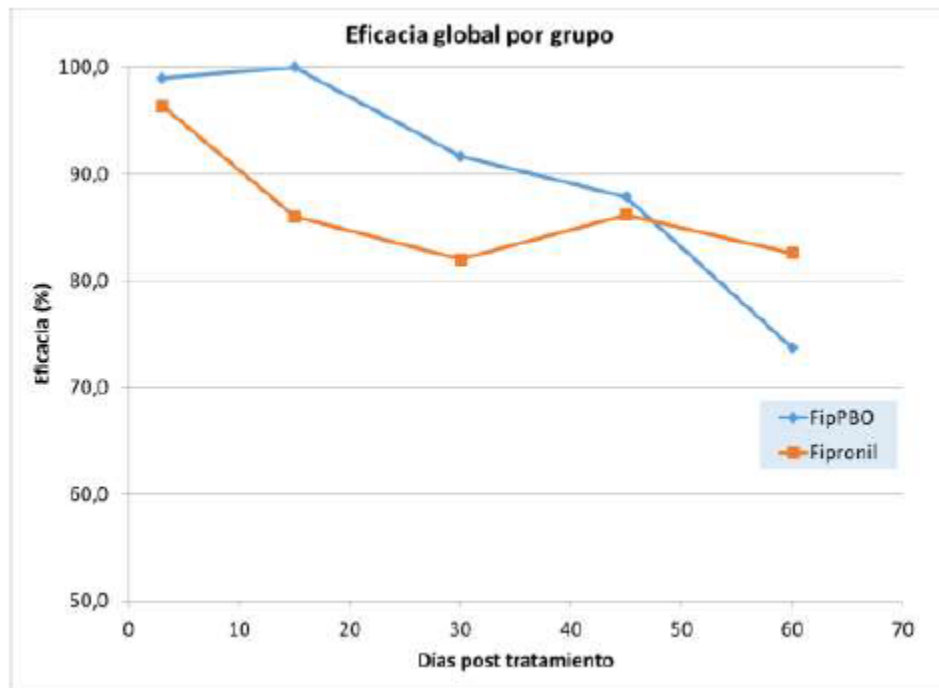
Se calculó la eficacia de cada compuesto a partir del promedio geométrico del recuento de pulgas de cada grupo, comparado con el recuento obtenido por el grupo el día previo a la aplicación del tratamiento, determinando los porcentajes de reducción (Tabla 4). Luego del tratamiento se observó una eficacia de 96,4% para Fipronil y de 99,0 para Fipronil+PBO, tendencia que mantuvo hasta el día 45 de la evaluación, indicando el Fipronil+PBO es más eficaz que el fipronil solo.

Tabla 4. Eficacia pulguicida de fipronil o Fipro+PBO

Compuesto	Día 3	Día 15	Día 30	Día 45	Día 60
Fipronil+PBO	98,99	100	91,671	87,85	73,70
Fipronil	96,39	86,01	81,98	86,20	82,60

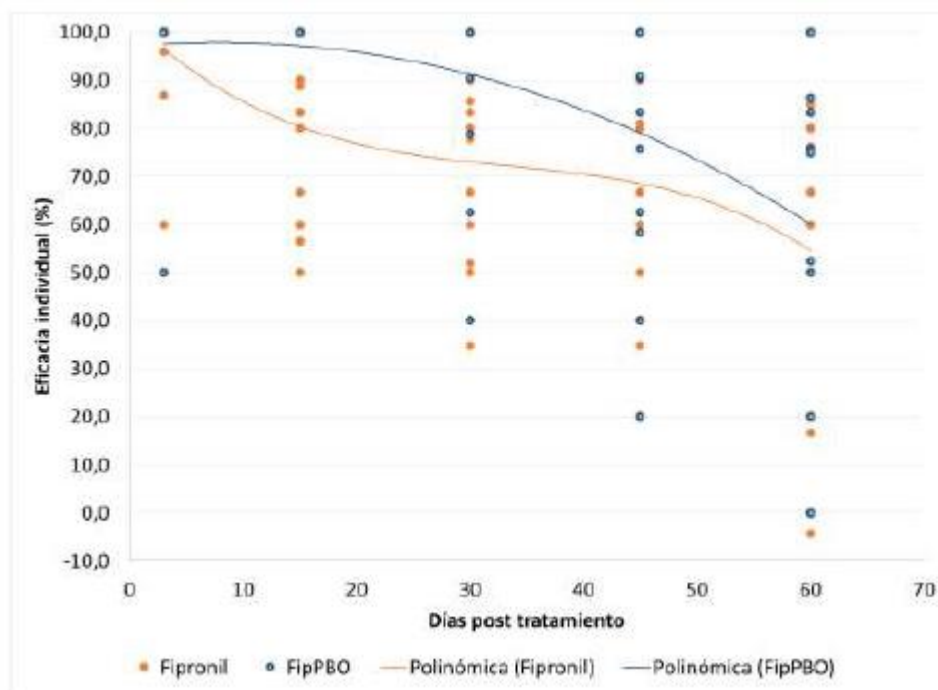
Se destaca, asimismo, que una eficacia superior al 85% se observó en Fipro+PBO hasta el día 45 de la aplicación, mientras el compuesto sin sinergista a los quince días de la aplicación presentaba una eficacia del 86%. Para el día 60 del tratamiento la eficacia fue inferior al 85% en ambos compuestos. Las curvas de eficacia a través del tiempo para cada producto, se prepararon con base en los promedios geométricos y el cálculo de eficacia comparando el recuento de cada fecha con el recuento pre tratamiento (Figura 2), utilizando la misma información que la presentada en la tabla 4. Debe notarse que como este tipo de cálculos se prepara con el promedio geométrico de cada grupo, no es posible introducir parámetros de dispersión, como límites de confianza o algo similar. Para tratar de solucionar esta limitante se calculó una variable llamada Eficacia Individual. En ella para calcular el porcentaje de reducción en el recuento de pulgas, cada animal sirvió como su propio control, comparando el porcentaje de reducción a partir del recuento observado el día 0 del estudio.

Figura 2. Curvas de eficacia en el tiempo para los dos compuestos, calculada a partir de la reducción del recuento por grupo.



La Figura 3 muestra la eficacia individual calculada de forma independiente para cada paciente para ambos compuestos. Para cada individuo participante en la evaluación su resultado se indica como un punto naranja para Fipronil solo o azul para Fipronil+PBO. Se prepararon curvas de regresión polinómica para cada compuesto, indicando la mayor tendencia del compuesto sinergizado en seguir brindando protección prolongada contra la infestación por pulgas. Durante las visitas de seguimiento a lo largo del estudio no se documentó la ocurrencia de ningún efecto adverso, como alopecia, alergias, enrojecimiento, entre otras, en ninguna de las 30 mascotas luego de la aplicación de los productos. En general, los pacientes tuvieron un buen estado de salud, pues no presentaron enfermedades graves a lo largo del estudio. Entre algunas observaciones reportadas por los propietarios al 3.3% (1/30) le realizaron la cirugía de castración, el 3.3% (1/30) presentó una cojera, y el 3.3% (1/30) sufrió de *Queratoconjuntivitis Sicca*; cabe aclarar que estas observaciones fueron ajenas e independientes a la aplicación del Fipronil y del Fipronil+PBO.

Figura 3. Curvas de eficacia individual para los dos compuestos, calculadas usando a cada animal como su propio control pre tratamiento.



Los estudios de laboratorio y de campo permitieron validar la eficacia insecticida de la mezcla de fipronil y butóxido de piperonilo (PBO) para el control de pulgas (*Ctenocephalides felis*) en mascotas, encontrando que esta mezcla es más eficaz que el fipronil solo, verificando así el efecto benéfico del sinergista como potencializador de la actividad insecticida. Al evaluar mediante una prueba *in vitro*, utilizando la fase no parasítica de la pulga, el efecto insecticida del fipronil solo y en combinación con PBO, se encontró que con la mezcla de fipronil más PBO se necesitan dosis letales (DE50 – DE90) menores que con el fipronil solo, y que las preparaciones individuales tienen un comportamiento diferente en el caso del fipronil solo.

Se determinó la eficacia plaguicida de una formulación de fipronil en combinación con PBO y de una formulación que contenga únicamente fipronil para el control de pulgas *Ctenocephalides felis* en caninos y felinos, mediante un ensayo clínico doble ciego en hogares residenciales de la ciudad de Bogotá, donde se encontró que la mezcla con el PBO tuvo porcentajes de reducción en el conteo de pulgas mayores que con el fipronil solo en los días 3, 15, 30 y 45.

Además, se demostraron las diferencias entre la eficacia y duración del efecto insecticida sobre las pulgas del uso del fipronil en combinación con PBO o de fipronil, evaluando el efecto en mascotas.

No se documentó ningún efecto adverso que pudiera ocurrir en las mascotas del ensayo doble ciego luego de la aplicación del producto, comprobando el beneficio de su uso para el control de pulgas en caninos y felinos.