

8
2 Ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**EVALUACION DE METODOS ANALITICOS PARA
CUANTIFICAR PRAZICUANTEL EN FLUIDOS
BIOLOGICOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

MARTA CECILIA CASTILLO DEL RIO

DIRECTOR: M. EN C. JUAN MANUEL

RODRIGUEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Cápitulo	Página
I. <u>INTRODUCCION</u>	1
II. <u>GENERALIDADES</u>	4
1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS	4
1.1. Nombre Químico y Sinónimos	4
1.2. Fórmula Condensada	4
1.3. Fórmula Desarrollada	4
1.4. Composición Porcentual	5
1.5. Peso Molecular	5
1.6. Solubilidad	5
1.7. Descripción	5
1.8. Punto de Fusión	5
1.9. Coeficiente de Partición	6
1.10. Estabilidad en Solución	6
2. FARMACOLOGIA DE PRAZICUANTEL	7
2.1. Aspectos Farmacodinámicos	7
2.1.1. Efectividad terapéutica y actividad farmacológica	7
2.1.2. Mecanismo de acción	12
2.1.3. Toxicidad clínica y preclínica	13
2.2. Aspectos Farmacocinéticos	17
2.2.1. Absorción y distribución	17

Capítulo	Página
2.2.2. Metabolismo	21
2.2.3. Excreción	22
3. METODOS DE VALORACION EN FLUIDOS BIOLOGICOS	23
3.1. Método Radioactivo	24
3.2. Fluorometría	24
3.3. Cromatografía de Gases	25
3.4. Cromatografía de Líquidos a Alta Presión	25
III. <u>PARTE EXPERIMENTAL</u>	27
1. DETERMINACION DE PRAZICUANTEL EN PLASMA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE GAS-LIQUIDO	27
1.1. Material y Equipo	27
1.2. Reactivos	27
1.3. Soluciones	28
1.4. Preparación de las Diluciones	29
1.5. Método de Extracción	30
1.6. Condiciones Cromatográficas	30
2. DETERMINACION DE PRAZICUANTEL EN PLASMA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS A ALTA PRESION	32
2.1. Material y Equipo	32

Capítulo	Página
2.2. Reactivos	32
2.3. Soluciones	33
2.4. Preparación de las Diluciones	34
2.5. Método de Extracción	35
2.6. Condiciones Cromatográficas*	38
3. PRUEBAS DE ESTABILIDAD EN PLASMA	38
IV. <u>RESULTADOS</u>	40
1. DETERMINACION DE PRAZICUANTEL EN PLASMA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE GAS-LIQUIDO	40
1.1. Linealidad	40
1.2. Determinación de la Concentra- ción Real y Porcentaje de Ex- tracción de Prazicuantel en Plasma	45
1.3. Coeficiente de Variación en la Extracción	47
2. DETERMINACION DE PRAZICUANTEL EN PLASMA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS A ALTA PRESION	47
2.1. Linealidad	48
2.2. Determinación de la Concentra- ción Real y Porcentaje de Ex- tracción de Prazicuantel en Plasma	53

Capítulo	Página
2.3. Coeficiente de Variación en la Extracción	54
3. PRUEBAS DE ESTABILIDAD EN PLASMA	56
V. <u>DISCUSION DE RESULTADOS</u>	57
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	64
VII. <u>APENDICES</u>	66
VIII. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	72

CAPITULO I

INTRODUCCION

La cisticercosis humana es una consecuencia de la ingestión de huevos de Taenia solium por contaminación fecal de los alimentos y agua. Las larvas, en el organismo, se desarrollan en cualquier tejido blando, incluyendo piel, tejido subcutáneo, músculo, cerebro, hígado, corazón, pulmón, riñón, ojos; si la invasión es en válvulas cardiacas o cerebro puede ocasionar transtornos funcionales graves y producirse así un desenlace fatal. En México y en el mundo, donde existe este padecimiento, puede con frecuencia desahuciarse a las personas que lo padecen^{3, 27}.

La cisticercosis cerebral es una enfermedad que, por su frecuencia y gravedad, constituye un serio problema de Salud Pública y de enorme daño económico. En México²⁷ pruebas inmunológicas han demostrado que 2% de la población tiene cisticercosis; en regiones como el Bajío la proporción aumenta hasta un 6%; de acuerdo a estadísticas del Hospital General de S.S.A.; se encuentra en 3.5% de las autopsias practicadas en dicho nosocomio; se informa también, que uno de cada diez pacientes que en México necesita cirugía cerebral para tratar crisis epileptiformes padece cisticercosis cerebral; en 182 pacientes por presunto tumor cerebral se encon-

traron 47 casos (25.8% de cisticercosis)²⁷. En México esta parasitosis se encuentra en el 1-4% de los cerdos.

De esta enfermedad se ha avanzado muy poco en la farmacoterapéutica; los medicamentos que hasta ahora se han utilizado tienen varias desventajas: A) Los que matan a Taenia solium (estado adulto) en el intestino, son fármacos que no se absorben y, por lo tanto, no pueden atravesar la barrera hematoencefálica y tener acción sobre el cisticerco^{32, 54} o B) Los fármacos, como metrifonato, que son capaces de matar al cisticerco e incluso de mejorar a ciertos pacientes, tienen el inconveniente de poseer un elevado poder tóxico, por lo cual su uso no se ha generalizado^{20, 53}.

Hasta la fecha el tratamiento de los parásitos en estado larvario ha sido quirúrgico y estriba en extirpar el mayor número posible de cisticercos: cuando los quistes están alojados en el cerebro, existe un elevado riesgo y consecuencias psicomotoras, ya que pocos enfermos curan y, generalmente, los que mejoran quedan con graves incapacidades físicas^{3, 5, 29}.

Durante los últimos siete años, se ha demostrado que prazicuantel posee actividad antihelmíntica, es eficaz contra los esquistosomas y céstodos adultos, jóvenes y larvas; posee un índice de seguridad alto y se observa una buena tolerancia en animales^{2, 15, 34, 50} y el hombre^{11, 12, 17, 22-24, 41}.

En México se ha utilizado con éxito el prazicuantel

en el tratamiento de cisticercosis del cerdo a nivel sistémico a dosis de 50 mg/kg/día; la administración oral produce muerte de cisticercos y durante quince días de tratamiento, la curación de la enfermedad⁷. En humanos ha sido eficaz en casos de cisticercosis subcutánea empleando dosis de 25 mg/kg/día durante tres días^{21, 38}.

Actualmente, en el Hospital de Enfermedades Tropicales y el Hospital General, se lleva a cabo un amplio estudio de la eficacia del prazicuantel contra la cisticercosis, reportándose hasta ahora que han sido tratados con éxito completo más de 200 enfermos que habían sido desahuciados por médicos. A los pacientes de este estudio se les administra el fármaco en dosis de 50 mg/kg/día^{40, 44, 52}.

El propósito de este trabajo es elaborar un método analítico para cuantificar prazicuantel en fluidos biológicos. Con él se podrían desarrollar estudios farmacocinéticos orientados a obtener una dosificación racional del fármaco, y estudios de biodisponibilidad y bioequivalencia para el control de calidad de productos farmacéuticos.

Los parámetros que se tomarán en cuenta para desarrollar este método son: linealidad, sensibilidad, repetibilidad, especificidad y concentración mínima detectable.

Estos parámetros, de acuerdo a modelos estadísticos, describen la confiabilidad del método.

CAPITULO I

GENERALIDADES

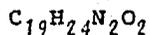
1. PROPIEDADES FISICOQUIMICAS

1.1. Nombre Químico

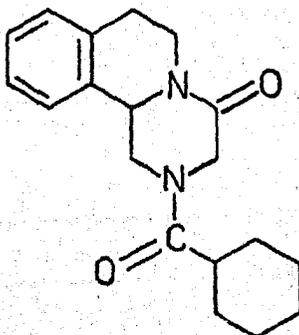
2-(ciclohexilcarbonyl)-1, 2, 3, 6, 7, 11b-hexahidro-4H-pirazino [2, 1-a] isoquinoleín-4-ona^{6, 42}.

Sinónimos: Prazicuantel, Droncit, Piquitón, Embay 8440, Biltricide, Cesol, Cisticide³⁰.

1.2. Fórmula Condensada



1.3. Fórmula Desarrollada



1.4. Composición Porcentual

Carbono 73.05%, Hidrógeno 7.74%, Oxígeno 10.24%,
Nitrógeno 8.97%.

1.5. Peso Molecular

312.41

1.6. Solubilidad

La solubilidad del prazicuantel es independiente del intervalo de pH comprendido entre 1 y 10. Es escasamente soluble en agua 0.043 g en 100 ml a 25°C y pH de 7.4³⁷; 9.7 g en 100 ml de etanol a 25°C y 56.7 g en 100 ml de cloroformo a la misma temperatura⁴².

1.7. Descripción

El prazicuantel es un sólido cristalino, de color blanco a amarillento, olor débil característico, posee sabor amargo y es inestable a la luz⁴².

1.8. Punto de Fusión

136-139°C⁴².

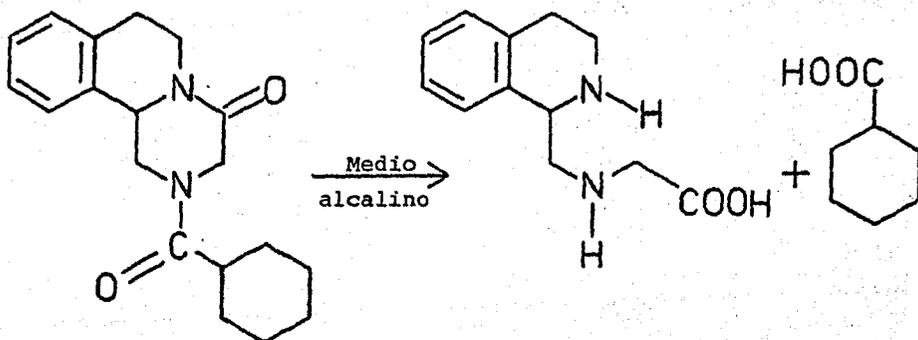
1.9. Coeficiente de Partición

Entre pH 1 y 10 es prácticamente independiente del mismo. Para un buffer acuoso de fosfato (pH=7) : ciclohexano es de 14:86 y para el mismo buffer : n-hexano de 38:62. En ácidos fuertes, como ácido sulfúrico 5-10 N y ácido clorhídrico 8 N, el prazicuantel puede ser extraído cuantitativamente de ciclohexano³⁷.

1.10. Estabilidad en Solución

En soluciones neutras o débilmente ácidas o alcalinas, la concentración de prazicuantel disminuye en una cantidad menor que el 2%, durante 16 horas a temperatura ambiente.

Prazicuantel puede sufrir hidrólisis en un medio fuertemente alcalino formando:



En plasma, a temperatura ambiente, el contenido dis-

minuyó en un 5% durante 16 horas. Cuando una solución en plasma u orina es almacenada a -60°C durante cuatro semanas no se observan cambios³⁷.

2. FARMACOLOGIA DE PRAZICUANTEL

2.1. Aspectos Farmacodinámicos

2.1.1. Efectividad terapéutica y actividad farmacológica

El prazicuantel es un antihelmíntico que ha mostrado tener actividad contra todas las especies de esquistosomas patógenas para el hombre, tanto in vivo como in vitro.

En parasitosis experimental debido a Squistosoma mansoni se pudo observar que prazicuantel (en ratón) es más efectivo con dosis repetidas que una dosis simple y alta³⁴; por otra parte, Andrews y colaboradores concluyeron que la eficacia de prazicuantel es independiente de edad, peso y sexo del animal huésped y de las especies de esquistosomas².

Se ha demostrado que prazicuantel es eficaz en solución inyectable (administración intramuscular y subcutánea) y en tabletas comerciales, en perros de diferentes edades y razas infectados con Equinococcus granulosus^{18,39,47}.

Marshal I. y colaboradores han propuesto que una formulación de liberación sostenida utilizando prazicuantel como

principio activo, provee una protección prolongada contra la reinfección de este parásito, siendo una alternativa para el control de *Equinococcus* y otras enfermedades parasitarias de importancia veterinaria³¹.

Las dosis administradas para el tratamiento de esquistosomiasis en el hombre, han sido de 20, 30 y 50 mg/kg/día, observándose una proporción de cura del 92-96%^{12,23,24}.

Hasta la fecha, se ha reportado el alivio de más de 25000 pacientes esquistosomíasicos, lo que conduce a que prazicuantel sea en la actualidad, el fármaco de elección para tratar esta parasitosis⁴³.

A este fármaco se le ha utilizado en el tratamiento de *Cysticercus cellulosa* del cerdo, a dosis de 50 mg/kg/día, durante quince días, observándose que es 100% efectivo⁷.

En casos de cisticercosis humana se ha utilizado prazicuantel por varios investigadores de acuerdo a la tabla I.

Se ha reportado la curación total de pacientes con cisticercosis subcutánea a dosis que varían entre 25-75 mg/kg/día de prazicuantel³⁹.

Al tratar una neurocisticercosis con prazicuantel, se produce la muerte del parásito en el sistema nervioso central ocasionando reacciones inflamatorias del tejido cerebral circundante. Esto trae como consecuencia un aumento en la presión intracraneana (principal causa de muerte en esta enfermedad) y edema cerebral. Lo anterior se ha prevenido con la

Tabla I

Investigadores	Dosis diaria (mg/kg)	Días de trata- tamiento	Tipo de cis- ticercosis	País	Ref.
Rim y col. 1980	75 (25X3)	3-4 + 4	c y sc	Corea	21
Brink y col. 1980	25 (8.3X3)	6	c	Chile	21
Robles Clemente 1980	50 (25X2)	15	c	México	38
Spina-Franca 1981	20 (6.6X3)	6 + 6	c	Brasil	21
Spina-Franca 1981	30 (10X3)	6 + 6	c	Brasil	21
Spina-Franca 1981	50 (16.6X3)	6 + 6	c	Brasil	21
Botero y Castaño 1981	30 (10X3)	6 + 6	c, o y sc	Colombia	5
Gómez y col. 1981	10 (3.3X3)	6 + 6	c y sc	Colombia	21
Galindo y Sedano 1982	50 (25X2)	15	sc	México	17

Diferentes regímenes de dosificación empleados para el tratamiento de cisticercosis en algunos países donde existe esta enfermedad. c = cisticercosis cerebral, sc = cisticercosis subcutánea, o = cisticercosis ocular.

administración de corticosteroides y diuréticos¹⁹.

En 1981 Chavarría y colaboradores⁴⁴ observaron que en muchos pacientes que habían recibido tratamiento con praziquantel se presentaban síntomas similares a los de cisticercosis cerebral. Posteriormente descubrieron que en la sangre del 30% de estas personas existía el Factor de Inhibición de los Macrófagos. Para resolver el problema, este grupo de investigadores propuso vacunar a los enfermos, después de dos meses del tratamiento con praziquantel, con una dosis de Calmette-Guerin con Mycobacterium tuberculosis (BCG) para desencadenar una respuesta inmune en el organismo que neutralizara las toxinas liberadas por los cisticercos calcificados.

Posteriormente, en 1983, Cal y Mayor propusieron el tratamiento ideal contra la cisticercosis, reemplazando el uso de corticosteroides por la administración intravenosa de histamina en forma concomitante de praziquantel y antígenos polivalentes por vía subcutánea. Ellos obtuvieron una respuesta buena o excelente, pues lograron suprimir la sintomatología causada por esta enfermedad⁹.

Por otra parte, se ha reportado que praziquantel no es eficaz contra la cisticercosis ocular cuando el parásito se localiza en humor vítreo, ya que esta zona carece de vasos sanguíneos⁵. Algo semejante ocurre en las formas cerebrales intraventriculares en que el cisticercos se encuentra en líquido cefalorraquídeo, donde las concentraciones alcanza-

das por el fármaco son muy bajas³⁹.

Hoy en día, el uso de prazicuantel permite por primera vez la posibilidad de tratar farmacológicamente la neurocisticercosis humana con altas probabilidades de éxito, sin tener necesariamente que recurrir a la cirugía, incluso en aquellos pacientes a los que las medidas médico-quirúrgicas tienen muy poco o nada que ofrecerles, en ocasiones contribuyendo decisivamente a salvar una vida²¹.

Dentro de la actividad farmacológica, se ha reportado, que prazicuantel en estudios in vitro, muestra tener actividad espástica y/o paralizante, contra céstodos, nemátodos y tremátodos que se encuentran en tejido aislado del huésped⁴⁶; Andrews señaló que una concentración plasmática de 0.3 µg/ml causa contracción y parálisis instantánea de Squistosoma mansoni en ratones².

Prazicuantel, en concentración de 350 µg/ml inhibe la colinesterasa de S. mansoni, bloqueando el 50% de su actividad. Este fármaco ejerce menor efecto sobre acetilcolinesterasa presente en cerebro de ratón, ya que inhibe el 30% de su actividad a concentración de 1400 µg/ml²⁵.

Thomas H. y col.⁵¹ reportaron que prazicuantel a una concentración de 0.1 µg/ml inhibe la captación de glucosa en céstodos adultos in vitro.

Por otra parte, se observó que este fármaco no posee efecto ovicida, sobre huevos localizados dentro y fuera

de proglótidis de Equinococcus granulosus⁴⁷.

In vitro, prazicuantel produce un efecto inotrópico positivo en concentraciones de 0.3-1.5 $\mu\text{g/ml}$, observándose que a concentraciones mayores provocaba arritmia y efecto asistólico⁸.

2.1.2. Mecanismo de acción

Se ha reportado que prazicuantel sobre esquistosomas adultos aumenta la permeabilidad de la membrana celular del músculo, dando como resultado una despolarización de esta², estimulando así el flujo de Ca^{2+} y Na^+ lo cual provoca la contracción en el parásito⁵¹; existen varias hipótesis para explicar este mecanismo:

Pintip R.³⁵ propone que debido a la naturaleza liposoluble de prazicuantel, puede interactuar con componentes lipídicos de la membrana tegumental asociados con los canales de calcio y así alterar el transporte de este ión; o bien puede afectar enzimas como Ca^{2+} -ATPasa.

Coles y col.¹⁰ proponen que prazicuantel puede abrir poros en la membrana permitiendo un rápido flujo de iones, acompañado por una acumulación aumentada de Ca^{2+} y Mg^{2+} en el parásito.

En investigaciones realizadas por Chubb y Bennett⁸ se concluyó que el flujo de Ca^{2+} provocado por prazicuantel en

músculo es mediado por otros mecanismos que no son por estimulación adrenérgica, inhibición de Na^+, K^+ -ATPasa, ni traslación de catión ionóforo.

Por otra parte, Köhler²⁶ observó en céstodos adultos que prazicuantel difunde a la mitocondria y en ella inhibe la actividad de NADH oxidasa lo que a su vez provoca la no formación de ATP. Este fármaco al alterar la permeabilidad de la membrana, ocasiona la pérdida de material orgánico, principalmente carbohidratos⁴⁹. La combinación de los dos factores anteriores provoca la muerte del parásito.

2.1.3. Toxicidad clínica y preclínica

La toxicidad aguda de prazicuantel determinada en diferentes especies animales se muestra en la tabla II.

En la tabla III se observan los resultados publicados por Frohberdy¹⁰, que muestran la toxicidad de prazicuantel después de administraciones orales repetidas. Los resultados se valoran en base a la conducta, peso corporal, ingestión de alimentos, órganos sensoriales, hematología, química sanguínea, autopsia, peso de órganos e histopatología.

Con respecto a la toxicología en la reproducción¹⁰, prazicuantel no tuvo efectos embriotóxicos ni teratogénicos en ratas y conejos, aún cuando efectos tóxicos maternos, como salivación aumentada y diarrea, fueron observados en animales gestantes.

Tabla II

Vía de administración	Especie (machos y hembras sanos)	DL ₅₀ mg/kg
Oral	Ratón	2454
	Rata	2976
	Conejo	1100
Subcutánea	Ratón	7268
	Rata	16000
Intramuscular	Ratón	2000
	Rata	1000
Intraperitoneal	Rata	795

Comparación de la toxicidad de prazicuantel entre especies y diferentes vías de administración. La toxicidad aguda en perros no pudo ser evaluada debido a que se presenta un efecto emético a 200 mg/kg de prazicuantel².

En dosis de 30, 100 y 300 mg/kg este fármaco no tuvo efecto alguno en la fertilidad del macho o de la hembra; ni en el cigoto, su transportación, implantación y desarrollo; ni en el parto, el recién nacido, la lactación, el destete y el desarrollo postnatal del producto; ni en la capacidad reproductiva de la generación F¹ y la generación F² en ratas.

Tabla III

Especie y cepa	Dosis (mg/kg)	Periodo de tratamiento	Resultado
Rata Wistar	0	4 semanas	Sin lesiones relacionadas con el medicamento
	30		
	100		
	300		
	1000		
Perro Beagle	0	4 semanas	Sin lesiones relacionadas con el medicamento
	30	13 semanas	
	60		
	180		

Toxicidad de prazicuantel. Se observa que después de la administración oral repetida durante cuatro semanas las ratas toleran niveles de dosificación diarios de 30, 100, 300 y 1000 mg/kg de prazicuantel, sin lesiones relacionadas al medicamento. En perros beagle, no causaron daño orgánico alguno después de tres meses bajo las condiciones experimentales dadas¹⁰.

Por otra parte, ninguna actividad mutagénica atribuible a prazicuantel fué informada a partir de ensayos con in-

intermediación de huésped con tres cepas de Salmonella typhimurium en ratones como animales huéspedes¹⁰. Sin embargo, Billings⁴ reportó que en bacterias y células animales (50 µg/ml de prazicuantel), puede actuar como un débil comutágeno en presencia de algunas sustancias mutagénicas y carcinogénicas.

Se realizaron pruebas combinadas de carcinogenicidad y toxicidad crónica en estudio de 2.5 años en ratas y 80 semanas en cricetos sirios. Los animales fueron tratados con 100 y 250 mg/kg/semana de prazicuantel. Los estudios se concluyeron demostrando baja toxicidad y ausencia de acción carcinogénica^{10,16,45}.

Se ha reportado⁷ que este fármaco no provoca irritación en mucosas (prueba en mucosa ocular de conejo) ni en la piel (prueba en humanos y cuyos).

En investigaciones realizadas en Zambia, Filipinas y Brasil^{12,23,24,41} con personas parasitadas con esquistosomas se observó que no hubo cambios en pruebas bioquímicas y hematológicas ni electrocardiograma después de la administración prolongada de prazicuantel; a dosis de 3 X 20 mg/kg/día, el 38% de los pacientes con edad de 5-72 años presentaron molestias o dolores abdominales, dolor de cabeza, sudoración, debilidad, náusea y vértigo. Estos efectos aumentaban conforme el estado de enfermedad era más avanzado.

En México, Robles⁴⁰ administrando prazicuantel 30 mg/

kg/día, durante quince días) a enfermos con neurocisticercosis, observó algunas reacciones secundarias como cefaleas, vómito, urticaria, agresividad, depresión mental, mareos e hiperglicemia en el 33% de los casos, desapareciendo al suspender el tratamiento.

2.2. Aspectos Farmacocinéticos

2.2.1. Absorción y distribución

Se ha reportado que prazicuantel después de su administración oral, es cuantitativa y rápidamente absorbidos en el tracto gastrointestinal. En algunas especies estudiadas se calculó la absorción oral en relación a una solución administrada intravenosamente, obteniéndose los siguientes resultados: mono rhesus 75%, rata wistar 77%, perro beagle 90%, oveja 100%. En esta investigación se observó que la concentración máxima de prazicuantel y sus metabolitos en suero, es alcanzada en un lapso de 30-60 minutos⁴⁵.

En estudios realizados in situ en ratas⁴⁷, se encontró que en seis horas, menos de la mitad de la dosis de prazicuantel fué absorbida en estómago; Xiao⁵⁵ reportó que el fármaco se absorbió en una proporción mayor en duodeno e ileon.

En hombres sanos, existe absorción enteral mayor del 80% de la dosis administrada de prazicuantel, observándose

que el tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima es de 1-3 horas.

Steiner y col.⁴⁶ investigaron los perfiles de distribución de prazicuantel marcado con C¹⁴ después de administraciones simples y repetidas, mediante soluciones oral e intravenosa en ratas wistar, los resultados obtenidos se encuentran en la tabla IV.

Como se muestra en la tabla IV, después de ambas vías de administración, prazicuantel se localiza principalmente en hígado y riñón.

Administraciones diariamente repetidas de este fármaco, en comparación de una dosis simple, en algunos órganos se presenta un pequeño aumento en la concentración; sin embargo, no existe acumulación organoespecífica después de varias administraciones⁴⁶.

La comparación de valores de prazicuantel en plasma, riñón, hígado y cerebro, mostró claramente que solo pequeñas cantidades llegan a este último, esto es, solamente 1/8 a 1/3 en comparación con el plasma. Resultados similares fueron obtenidos por Andrews quien investigó la penetración de prazicuantel a través de la barrera hematoencefálica en ratas. La concentración en el líquido cefalorraquídeo fué de 1/5 a 1/7 de la cantidad de prazicuantel en plasma. Únicamente el fármaco inalterado se distribuye en cerebro, ya que los metabolitos no son capaces de penetrar la barrera hemato

Tabla IV

	Admón. iv. 2 mg/kg					Admón. oral 10 mg/kg				
	5 min	1 h	8 h	24 h	24*	30 min	2 h	8 h	24 h	24 h*
Plasma	1.03	0.21	0.09	0.01	0.04	0.29	0.24	0.10	0.02	0.04
Hígado	3.97	0.97	0.32	0.04	0.14	2.11	1.16	0.45	0.04	0.19
Riñones	2.18	0.47	0.24	0.02	0.10	0.93	0.71	0.29	0.02	0.14
Músculo	0.59	0.11	0.06	0.01	0.02	0.11	0.15	0.07	0.01	0.02
Grasa	0.60	0.29	0.05	0.01	0.03	0.14	0.09	0.04	0.01	0.04
Cerebro	0.57	0.05	0.02	0.01	0.01	0.04	0.03	0.02	0.01	0.01

Distribución de radioactividad (en % de dosis de prazicuantel) en algunos órganos de rata. * = Resultados obtenidos después de administrar tres dosis aplicando una diariamente.

encefálica⁴⁶.

En investigaciones⁴⁶ acerca del paso de prazicuantel a través de placenta se mostró que 24 horas después de una administración intravenosa del fármaco se encontraba únicamente el 0.3% de la dosis en el feto, lo que indica que este fármaco difícilmente atraviesa la barrera placentaria.

Pütter y col.³⁶ observaron que en diez mujeres lactantes, saludables, las concentraciones en plasma fueron, en promedio, cuatro veces más elevadas que las concentraciones en leche. Los valores promedio de las concentraciones en leche aumentaron y disminuyeron de acuerdo con las concentraciones plasmáticas.

En cuanto a su distribución en parásitos Thomas y col.⁵² establecieron que en taenias adultas el prazicuantel marcado con C¹⁴ se distribuyó homogéneamente a través de los tejidos, mostrando que no hay acumulación selectiva en ciertos órganos de los parásitos. Con respecto a los cisticercos, el fármaco es capaz de penetrar la pared del quiste y destruirlo dentro. Sin embargo, a partir de los estudios de captación del prazicuantel marcado, se ha observado que la pared quística es una barrera de penetración del fármaco. La concentración de prazicuantel fué de cuatro a diez veces mayor en la pared quística que en el tejido larvario contenido en el quiste.

2.2.2. Metabolismo

Diekman y col.¹³ investigaron el metabolismo de praziquantel en diferentes especies animales, observando que treinta minutos después de su administración oral, solamente 1% de la cantidad total en plasma es fármaco inalterado. En contraste con esto, cantidades considerables de praziquantel estuvieron presentes en suero durante un periodo prolongado de tiempo después de una inyección intravenosa. Esta diferencia se debe a que se presenta un intenso metabolismo hepático, efectuado antes de que praziquantel alcance la circulación general, siendo particularmente prominente en ratas, mono rhesus y menos notable en perros beagle. Sin embargo, se observó que no hay diferencias cualitativas en los metabolitos utilizando diferentes vías.

En estudios realizados en ratas²⁸ demostraron que el metabolismo de praziquantel puede ser inducido por la administración de fenobarbital.

Andrews¹ observó en ratones parasitados con Squitosoma mansoni una reducida capacidad de biotransformación en el hígado, con respecto a animales sanos, provocando que el praziquantel inalterado permanezca por mayor tiempo en sangre, de este modo, aumenta el área bajo la curva de gráficas que representan la concentración de praziquantel en plasma con respecto al tiempo, incrementando así la biodisponibilidad y el tiempo de vida media del fármaco en ratones infecta

dos.

Investigaciones realizadas con prazicuantel marcado con C¹⁴ mostraron que S. mansoni es incapaz de transformar al fármaco metabólicamente.

Leopold²⁸ en sus investigaciones efectuadas en voluntarios sanos, encontró una diferencia de casi cien veces entre la concentración sérica de prazicuantel no metabolizado con respecto a la del fármaco total (inalterado y metabolitos). Después de dosis orales únicas de 5, 10, 20 y 50 mg/kg se observó una dosis-dependencia en las concentraciones de prazicuantel inalterado. Esto puede indicar que el metabolismo dependió de la dosis en cuanto a capacidad. En este estudio se concluyó que el metabolismo de este fármaco, es cualitativamente independiente de sexo y dosis administrada³³.

Andrews y col.² trabajando con metabolitos formados en el hombre, reportó que estos son de extremadamente baja o carente actividad antiesquistosomal.

2.2.3. Excreción

El prazicuantel es rápidamente excretado como una diversidad de metabolitos, predominantemente por riñón, en ratas, monos, perros y humanos. Las porciones principales del compuesto administrado fueron recuperados principalmente en la orina; no encontrándose diferencia de metabolitos después de la administración oral e intravenosa; la ruta fecal, como

vía de eliminación, fué de menor interés para todas las especies investigadas¹³.

En los animales estudiados, la excreción ocurrió como una variedad de metabolitos, algunos de ellos conjugados con ácido glucurónico y/o sulfúrico y con grupo hidroxí¹³.

En el hombre, la eliminación renal en cuatro días fué de más del 80%, y de esta cantidad más del 90% fué excretada en las primeras 24 horas. Después de una dosis única, solamente del 0.0001 al 0.001% de la dosis fué eliminada como prazicuantel inalterado en orina, en un periodo de tiempo de 0 a 24 horas; los principales productos de eliminación son metabolitos conteniendo uno o dos grupos hidroxí dentro de la molécula del fármaco³⁴. En hombres saludables, se observó que el tiempo de vida media del fármaco fue de 1.0 a 1.5 horas y 4.0 horas para fármaco total (inalterado y metabolitos)

28

En mujeres lactantes sanas³⁶, la excreción en la leche fué de 0.008% de la dosis administrada, y un tiempo de vida media de 2.1 horas.

3. METODOS DE VALORACION EN FLUIDOS BIOLOGICOS

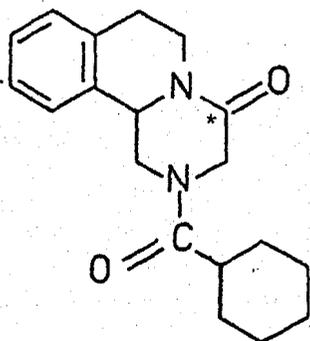
Para estudios farmacocinéticos y de biodisponibilidad de prazicuantel en hombres y animales, es necesario la determinación de este fármaco y sus metabolitos en fluidos bioló-

gicos.

Los métodos analíticos seben ser muy sensibles, ya que las concentraciones que se encuentran en fluidos biológicos son del orden de $\mu\text{g/ml}$.

3.1. Método Radioactivo

Para la determinación radioactiva de prazicuantel en órganos^{13,46} y fluidos biológicos⁴⁵, se ha utilizado la molécula del fármaco marcado con C^{14} , de la siguiente forma:



El método es muy sensible, pero no es específico, ya que no nos diferencia el prazicuantel inalterado de sus metabolitos³³.

3.2. Fluorimetría

El método fluorométrico se ha utilizado para la determinación de prazicuantel en plasma^{33,36,37}, orina¹⁷ y leche

De acuerdo a las investigaciones realizadas por Pütter J.³⁷ el método es muy sensible, presenta un límite de determinación muy bajo, 3 ng/ml en plasma sanguíneo y 4 ng/ml en leche. Para los fluidos anteriores el coeficiente de variación es del 7.5% a una concentración de 200 ng/ml^{36,37}. Este método presenta linealidad en un intervalo de concentración de 25 ng a 2 µg/ml³⁷.

3.3. Cromatografía de Gases

Diekman¹⁴ estableció un método para cuantificar praziquantel en fluidos biológicos por medio de cromatografía de gas-líquido, en las determinaciones utilizó un detector de ionización de flama alcalina. De acuerdo a las condiciones probadas, este investigador encontró que el límite de determinación en suero para el fármaco es de 10 ng/ml, y el coeficiente de variación, para una concentración sérica de 0.1 µg/ml es de 4.5%.

3.4. Cromatografía de Líquidos a Alta Presión

Shua-Xua y col.⁴³ probaron para la determinación cuantitativa de praziquantel, en suero, un método analítico uti-

lizando cromatografía de líquidos a alta presión.

Con las condiciones propuestas, el método ofrece un límite de sensibilidad de prazicuantel en suero de 2.5 ng/ml; coeficiente de variación de 2.6% a una concentración de 2.5 ng/ml y linealidad en intervalo de concentraciones de 60 a 800 ng/ml.

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

1. DETERMINACION DE PRAZICUANTEL EN
PLASMA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA
DE GAS-LIQUIDO

1.1. Material y Equipo

Balanza analítica Mettler modelo H 54-AR .

Agitador mecánico Lab-Line Instruments/Dubnoff incu-
shaker modelo 3575

Agitador Vortex^R Sybron Thermolyne modelo M-16715

Centrífuga Damon/IEC-Division modelo HN-SII

Cromatógrafo de gases Varian modelo 3700, equipado
con detector de ionización de llama

Registrador Varian modelo 9176

1.2. Reactivos

Prazicuantel químicamente puro obtenido de Merck

Estándar interno: 2 cicloheptil-carbonil-4 oxo-1, 2,
3, 6, 7, 11 b-hexahidro-4H-pirazino-(2, 1a)-isoquinolefina
proporcionado por Merck

Lentejas de hidróxido de sodio, reactivo analítico,
Técnica Química S.A.

Fosfato de potasio monobásico, reactivo analítico,
Química JVC

Fosfato de potasio dibásico, reactivo analítico, Quí-
mica JVC

Sulfato de sodio anhidro, reactivo analítico, Química
JVC

Acetona, grado reactivo, J. T. Baker

Acetato de etilo, reactivo analítico, Química JVC

Eter isopropílico, reactivo analítico, J. T. Baker

Disulfuro de carbono, reactivo analítico y bidestila-
do, J. T. Baker

1.3. Soluciones

Hidróxido de sodio 0.2 N

Mezcla de acetato de etilo-éter isopropílico (3:7,
v/v)

Buffer de fosfatos pH = 6

Soluciones de prazicuantel en acetona concentraciones
de 1000, 8, 4, 2 y 1 µg/ml

Soluciones de prazicuantel en plasma concentraciones
de 8, 4, 2 y 1 µg/ml

Solución de estándar interno (cicloheptil homólogo de

prazicuantel) concentración de 96 $\mu\text{g/ml}$ disuelto en disulfuro de carbono.

1.4. Preparación de las Diluciones

Se pesaron 10 mg de prazicuantel en un matraz volumétrico de 10 ml, se aforó con acetona.

80 microlitros de la solución anterior se colocaron en un matraz volumétrico de 10 ml y se aforó con plasma (concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$).

Una alícuota de 5 ml de la solución descrita anteriormente, se aforó con plasma hasta un volumen de 10 ml (concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$).

Las soluciones de concentración de 2 y 1 μg de prazicuantel por ml de plasma, se prepararon una a partir de otra, siguiendo el procedimiento anterior.

De manera similar, a la que anteriormente se describe, se prepararon las soluciones de 8, 4, 2 y 1 $\mu\text{g/ml}$ disueltos en acetona.

Se pesaron 24 mg de estándar interno de prazicuantel, en un matraz de 25 ml, se aforó con disulfuro de carbono. Una alícuota de 1 ml de esta solución, se llevó con el mismo disolvente a un volumen de 10 ml, en un matraz volumétrico, obteniendo una solución de 96 $\mu\text{g/ml}$.

1.5. Método de Extracción

Se efectuó la extracción de prazicuantel en plasma de acuerdo al esquema 1, en el que se muestra que, a partir de 2 ml de plasma previamente alcalinizado, se adiciona una mezcla de disolventes, se agita suavemente y se separan las fases; posteriormente, la fase orgánica se lava con una solución amortiguadora (pH = 6) para la eliminación del álcali, el extracto se seca y evapora. El residuo se reconstituye con disulfuro de carbono conteniendo el estándar y se analiza en cromatografía de gas-líquido.

1.6. Condiciones Cromatográficas

Columna: material de vidrio, longitud 168 cm y diámetro interno de 2 mm

Fase estacionaria: aceite de silicona OV-3 al 1.5% sobre Chromosorb W-H-P, malla 80/100.

Gas portador: Nitrógeno, flujo 25 ml/min

Temperatura de inyector: 290°C

Temperatura de detector: 300°C

Temperatura de columna: 250°C

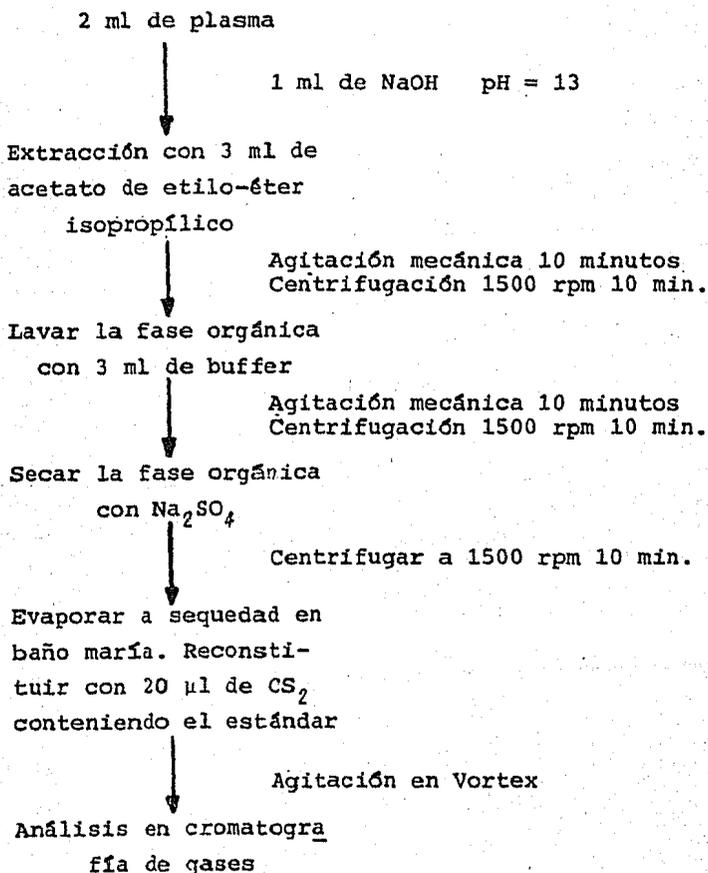
Velocidad de la carta: 2.5 mm/min

Las condiciones de temperatura programada:

Temperatura de inyector: 290°C

Temperatura de detector: 300°C

Esquema 1



Técnica empleada para la extracción de praziquantel en plasma.

Temperatura inicial de columna 240°C durante 3 minutos, aumentando 2°C cada 2 minutos, hasta una temperatura final de 250°C, manteniéndose 12 minutos.

2. DETERMINACION DE PRAZICUANTEL EN PLASMA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS A ALTA PRESION

2.1. Material y Equipo

Balanza analítica Mettler modelo H 54-AR

Agitador mecánico Lab-Line Instruments/Dubnoff incubator modelo 3575

Agitador Vortex^R Sybron Thermolyne modelo M-16715

Centrífuga Damon/IEC-Division modelo HN-SII

Cromatógrafo de líquidos Perkin Elmer series 2

Detector de longitud de onda variable LC-75

Estación de datos Perkin Elmer sigma 15

2.2. Reactivos

Prazicuantel químicamente puro obtenido de Merck

Cicloheptil homólogo de prazicuantel (estándar interno) proporcionado por Merck

Lentejas de hidróxido de sodio, reactivo analítico,
Técnica Química S.A.

Fosfato de potasio monobásico, reactivo analítico,
Química JVC

Fosfato de potasio dibásico, reactivo analítico, Química JVC

Sulfato de sodio anhidro, reactivo analítico, Química JVC

Acetona, grado reactivo, J. T. Baker

Acetonitrilo HPLC Merck

Agua deionizada y filtrada para cromatografía de líquidos.

2.3. Soluciones

Hidróxido de sodio 0.2 N

Mezcla de acetato de etilo-éter isopropílico (3:7, v/v)

Buffer de fosfatos de pH = 6

Soluciones de prazicuantel en acetona concentración de 1000, 10, 8, 4, 2 y 1 µg/ml.

Soluciones de prazicuantel en plasma concentración de 10, 8, 4, 2, 1, 0.5 y 0.25 µg/ml.

Soluciones de estándar interno concentraciones de 20 y 10 µg/ml disuelto en agua-acetonitrilo (1:1, v/v).

2.4. Preparación de las Diluciones

Se pesaron 10 mg de prazicuantel en un matraz volumétrico de 10 ml, aforándose con acetona.

Un volúmen de 200 microlitros de la solución descrita anteriormente, se colocó en un matraz de 10 ml y se aforó con plasma (concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$).

Cinco ml de la solución anterior se aforaron a un volúmen de 10 ml con plasma (concentración de prazicuantel 10 $\mu\text{g/ml}$).

Para obtener una concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$, se tomaron 4 ml de la solución que contenía 20 μg de prazicuantel por ml de plasma hasta un volúmen de 10 ml.

Una alícuota de 5 ml de la solución descrita anteriormente (8 $\mu\text{g/ml}$) se aforó con plasma hasta obtener 10 ml (concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$).

Las soluciones de 2, 1, 0.5 y 0.25 $\mu\text{g/ml}$ se prepararon una a partir de la otra, siguiendo el procedimiento anterior.

De manera similar a la que anteriormente se describe, se prepararon las soluciones de prazicuantel de 10, 8, 4, 2 y 1 $\mu\text{g/ml}$ en acetona.

Se pesaron 10 mg de estándar interno de prazicuantel en un matraz volumétrico de 10 ml, aforándose posteriormente, con una mezcla de agua-acetonitrilo. Una alícuota de 1 ml de

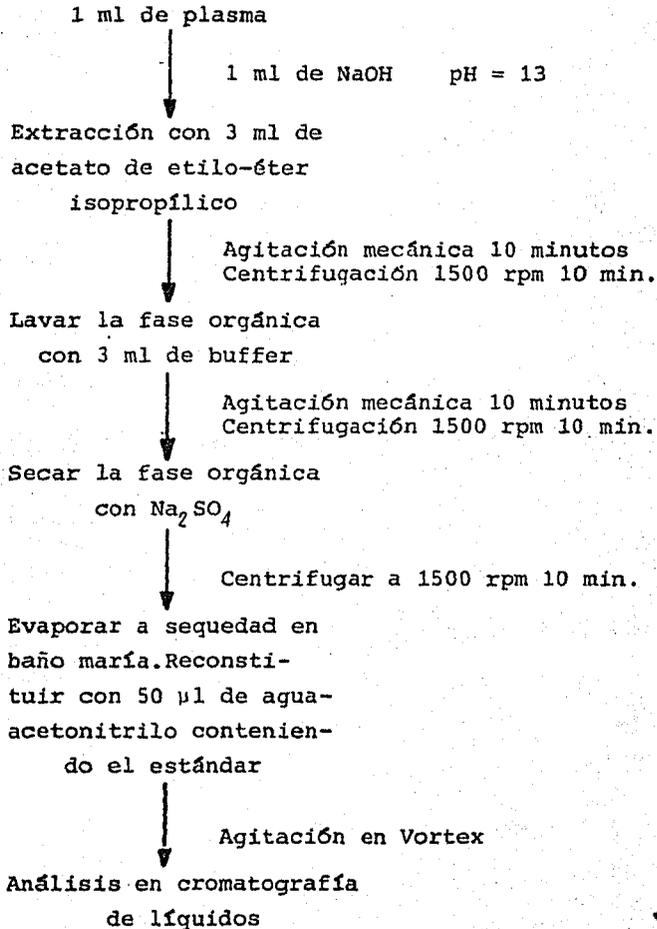
esta solución, se llevó, con el mismo disolvente a un volúmen de 10 ml. De la solución anterior se tomaron 2 y 1 ml, aforándose a un volúmen de 10 ml para obtener concentraciones de 20 y 10 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente.

2.5. Método de Extracción

Se efectuó la extracción de prazicuantel en plasma de acuerdo al esquema 2. La técnica empleada es semejante a la que se describe en el esquema 1 (sección III.1.5.) donde se utiliza el doble de la cantidad de muestra que en cromatografía de líquidos (esquema 2), por otra parte, el disolvente en el que se reconstituye el residuo, una vez evaporada la muestra es diferente (disulfuro de carbono para analizar en cromatógrafo de gases y acetonitrilo-agua para cromatografía de líquidos).

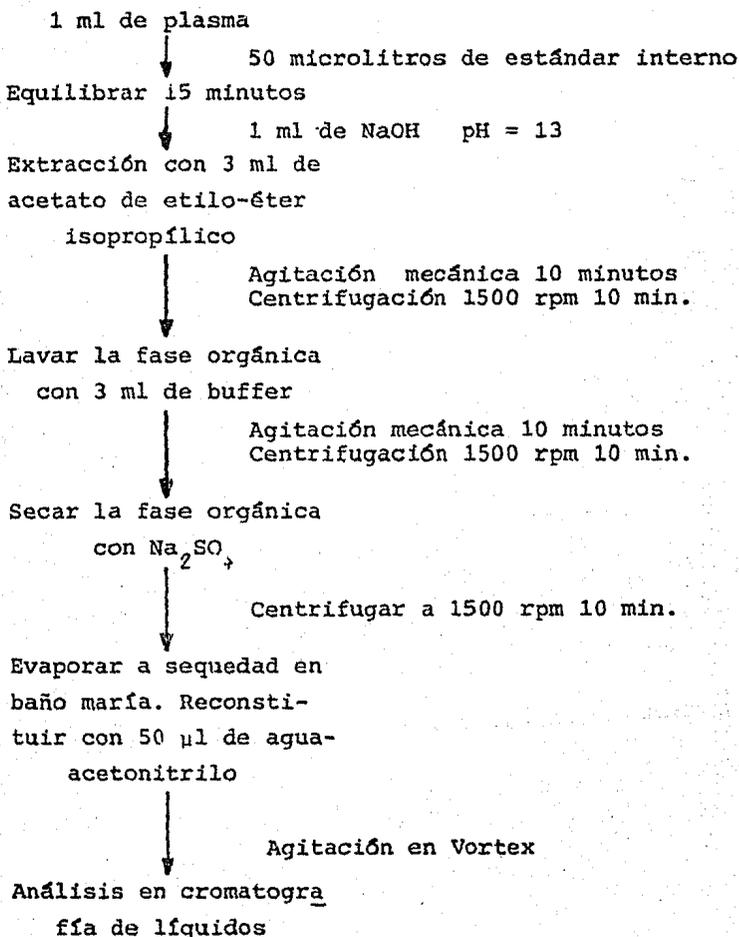
El esquema 3 muestra la metodología de extracción empleada para el tratamiento de muestras plasmáticas con bajas concentraciones de prazicuantel. En esta técnica, comparando la con la seguida en el esquema 2, se puede observar que el estándar se agrega a la muestra antes de la extracción con solventes.

Esquema 2



Técnica empleada para la extracción de prazicuantel en plasma (concentración de muestras: 10, 8, 4, 2 y 1 $\mu\text{g/ml}$).

Esquema 3



Técnica empleada para la extracción de praziquantel en plasma (concentraciones de las muestras: 2, 1, 0.5 y 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

2.6. Condiciones Cromatográficas

Columna: longitud 30 cm, diámetro externo 5 mm

Fase estacionaria: Lichrosorb RP-18 (octadecil silano), tamaño de partícula 10 micras

Fase móvil: mezcla de agua-acetonitrilo (1:1, v/v)

Flujo: 1.5 ml/min

Longitud de onda: 217 nm

Velocidad de la carta: 10 mm/min

3. PRUEBAS DE ESTABILIDAD EN PLASMA

Para investigar la estabilidad de prazicuantel en plasma durante su almacenamiento se preparó la siguiente solución:

300 microlitros de una solución de concentración de 1 mg/ml se colocaron en un matraz volumétrico de 25 ml, el cual se aforó con plasma. De la solución resultante se tomaron alícuotas de 5 ml y se guardaron en tubos tapados (tapón de rosca) y protegidos de la luz (envueltos en papel aluminio) a temperatura de -10°C .

Los tubos descritos anteriormente, fueron analizados a la 0, 1, 2, 3 y 4^a semana de su preparación utilizando la metodología de extracción indicada en el esquema 2 (sección III.2.5.).

Las muestras se prepararon a partir de 1 ml de plasma

previamente alcalinizado, adicionando una mezcla de disolventes, se agitó suavemente y se separaron las fases por centrifugación. La fase orgánica se lavó con una solución amortiguadora, para la eliminación del álcali, el extracto se secó y se evaporó. El residuo se reconstituyó con agua-acetonitrilo y se analizó por cromatografía de líquidos.

CAPITULO IV

RESULTADOS

1. DETERMINACION DE PRAZICUANTEL EN
PLASMA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA
DE GAS-LIQUIDO

Bajo las condiciones cromatográficas propuestas (sección III.1.6.) se obtuvo que la concentración mínima detectable, después del tratamiento de las muestras corresponde a 0.5 µg de prazicuantel por ml de plasma.

Las figuras 1 y 2 muestran cromatogramas típicos obtenidos en el análisis de muestras plasmáticas, en los cuales se observó que el prazicuantel tiene un tiempo de retención de 9.7 minutos y el estándar interno de 14.53 minutos, bajo las condiciones de temperatura constante en la columna (sección III.1.6.). Los tiempos de retención de prazicuantel y estándar fueron de 12.9 y 17.8 minutos respectivamente utilizando temperatura programada.

1.1. Linealidad

La linealidad se determinó preparando cuatro curvas de calibración de prazicuantel en plasma, a concentraciones

EVALUACION DE METODOS ANALITICOS PARA CUANTIFICAR
 PRAZICUANTEL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

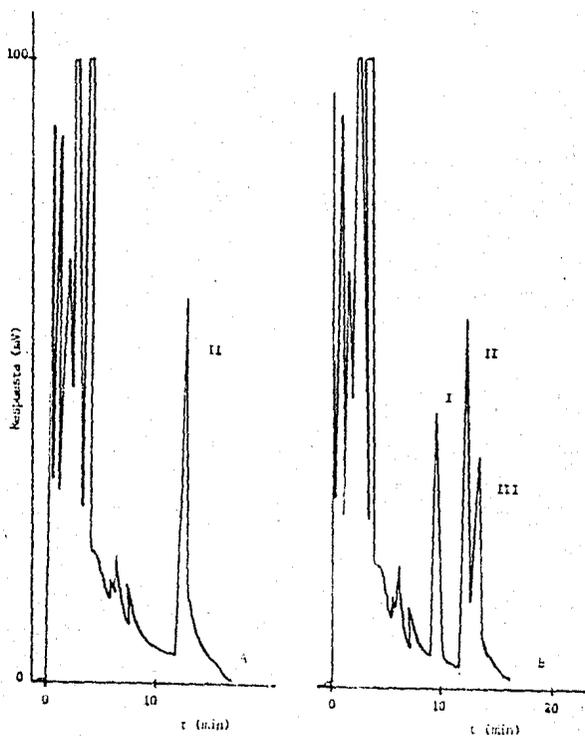


Figura 1. Cromatogramas obtenidos al analizar A = blanco plasmático, B = muestra plasmática con prazicuanTEL. En ambos se utilizó cromatografía de gases con temperatura de columna constante (250°C). I = prazicuanTEL II = colesterol III = estándar interno.

Castillo 1967.

EVALUACION DE METODOS ANALITICOS PARA CUANTIFICAR
PRAZICUANTEL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

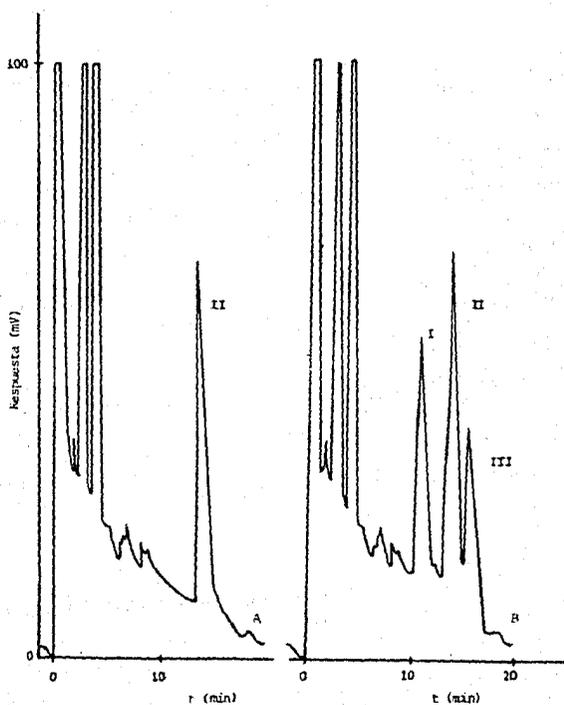


Figura 2. Cromatogramas obtenidos al analizar: A = blanco plasmático, B = muestra plasmática con prazicuan-
tel. I = prazicuan-
tel II = colesterol III = estándar interno *Castillo 1988.*

de 8, 4, 2 y 1 $\mu\text{g/ml}$, de acuerdo a la sección III.1.5.. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla V.

La representación gráfica de los resultados (figura 3) muestra que estos se encuentran sobre una línea recta, el coeficiente de correlación (r) es un valor cercano a 1, lo que indica que el método empleado es lineal en el intervalo de concentración de 1 a 8 μg de prazicuantel por ml de plasma.

Tabla V

Concentración de prazicuantel ($\mu\text{g/ml}$)	Relación de áreas prazicuantel/est. (EEM)	Coefficiente de variación estándar (%)
1	0.269 (0.016)	5.948
2	0.557 (0.033)	5.924
4	0.885 (0.042)	4.746
8	1.934 (0.069)	3.568
$r = 0.996$	$I = 0.034$	$m = 0.234$

Promedio de los resultados obtenidos a partir de cuatro curvas estándar de prazicuantel. Las áreas se determinaron mediante triangulación. (EEM) = Error estándar medio.

EVALUACION DE METODOS ANALITICOS PARA CUANTIFICAR
PRAZICUANTEL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.

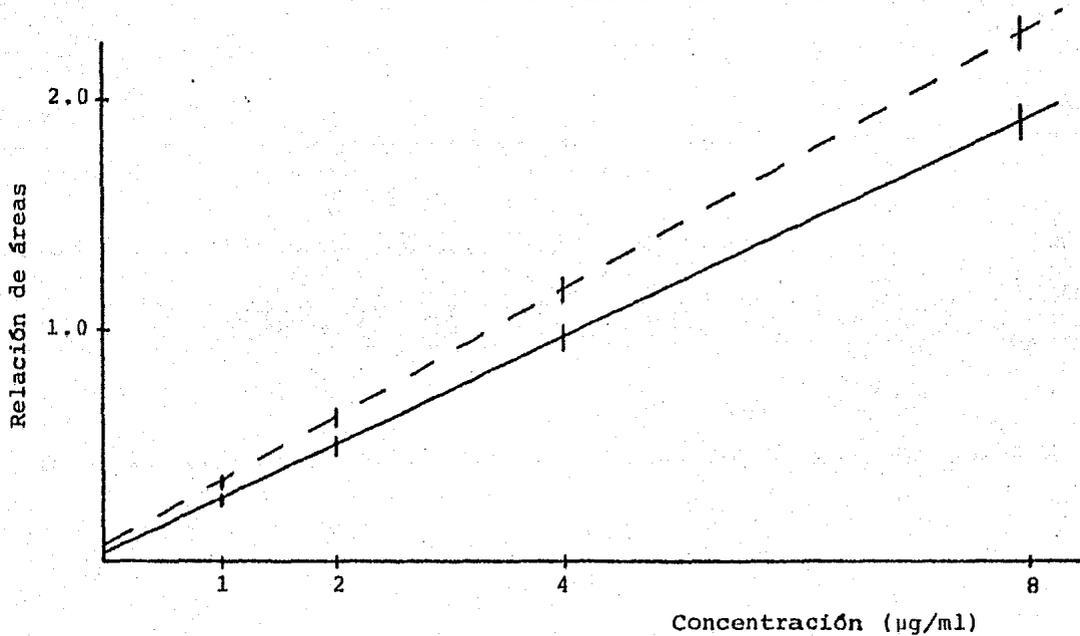


Figura 3. Gráfica promedio de la relación de áreas (prazicuanTEL/estándar) (\pm EEM) con respecto a la concentración de prazicuanTEL, empleando cromatografía de gases.

— Muestras plasmáticas (tabla V) — — — Muestras preparadas en acetona (tabla VI).

Castillo 1984.

1.2. Determinación de la Concentración Real y Porcentaje de Extracción de Prazicuantel en Plasma.

Se prepararon cuatro curvas de prazicuantel en acetona, con 8, 4, 2 y 1 $\mu\text{g/ml}$, posteriormente se evaporó el solvente en baño maría. Los resultados se encuentran en la tabla VI.

Tabla VI

Concentración de prazicuantel ($\mu\text{g/ml}$)	Relación de áreas prazicuantel/est. (EEM)	Coefficiente de variación estándar (%)
1	0.356 (0.015)	4.213
2	0.696 (0.029)	4.167
4	1.044 (0.036)	3.448
8	2.332 (0.066)	2.830
$r = 0.994$	$I = 0.067$	$m = 0.227$

Promedio de los resultados obtenidos a partir de cuatro curvas estándar de prazicuantel en acetona. (EEM) = Error estándar medio.

Con el fin de calcular el rendimiento en la extracción utilizada se elaboró la tabla VII, en la cual se presentan los datos obtenidos en el tratamiento de muestras plasmáticas y evaporadas.

Las curvas de calibración obtenidas utilizando la metodología de extracción en plasma con respecto a muestras evaporadas en acetona se muestran en la figura 3.

Tabla VII

Concentración de prazicuantel ($\mu\text{g/ml}$)	Promedio de mtas. plasmáticas	Promedio de mtas. evaporadas	Extracción (%)
1	0.269	0.359	75.562
2	0.557	0.696	80.029
4	0.885	1.044	84.770
8	1.934	2.332	82.993
Promedio = 80.823% Error estándar medio = 2.007 %			

Rendimiento en la extracción de prazicuantel en plasma.

1.3. Coeficiente de Variación en la Extracción

El coeficiente de variación estándar en la extracción se determinó preparando por cuatrimplicado muestras con 8, 4, 2 y 1 μg de prazicuantel por ml de plasma, bajo las condiciones descritas en la sección III.1.5..

Los cálculos se efectuaron, para cada concentración, utilizando la relación siguiente:

$$\text{Coeficiente de variación estándar} = \frac{\text{Error estándar medio}}{\text{Media aritmética}} \times 100$$

En los resultados (tabla V), muestran un coeficiente de variación entre 5.948 y 3.568%, en este intervalo de concentraciones.

2. DETERMINACION DE PRAZICUANTEL EN PLASMA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS A ALTA PRESION

Bajo las condiciones cromatográficas que señala la sección III.2.6., se obtuvo que la concentración mínima detectable, después del tratamiento de las muestras corresponde a

0.125 μg de prazicuantel por ml de plasma.

En la figura 4 se presentan los cromatogramas típicos obtenidos al analizar muestras plasmáticas, observándose un tiempo de retención de 5.86 minutos para el prazicuantel y de 7.11 minutos para el estándar interno.

2.1. Linealidad

Con el fin de determinar si la relación entre concentración y relación de áreas era lineal se elaboraron cuatro curvas de calibración en el intervalo de concentración de 1 a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de acuerdo al esquema 2 (sección III.2.5.). En la tabla VIII se muestran los resultados obtenidos.

Los datos presentados en la tabla VIII se muestran gráficamente en la figura 5.

Por otra parte, se determinó la linealidad del método empleando muestras plasmáticas de concentración de 2, 1, 0.5 y 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, de acuerdo al esquema 3 (sección III.2.5.). La tabla XI muestra los resultados obtenidos y son graficados en la figura 6.

EVALUACION DE METODOS ANALITICOS PARA CUANTIFICAR
PRAZICUANTEL EN FLUIDOS BIOLOGICOS

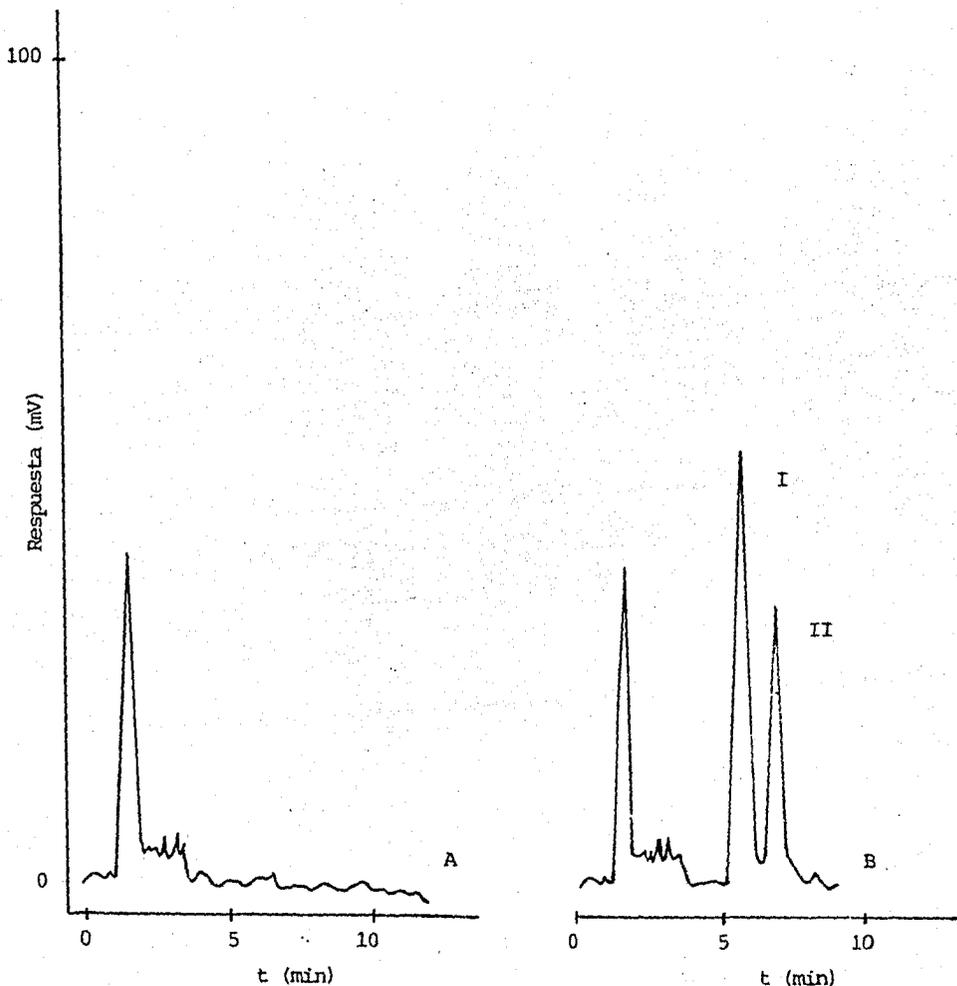


Figura 4. Cromatogramas obtenidos utilizando cromatografía de líquidos a alta presión. A = blanco plasmático B = muestra plasmática con prazicuanTEL. I = prazicuanTEL II = estándar interno.

Castillo 1984.

Tabla VIII

Concentración de prazicuantel ($\mu\text{g/ml}$)	Relación de áreas prazicuantel/est. (EEM)	Coefficiente de variación estándar (%)
1	0.348 (0.030)	8.621
2	0.642 (0.052)	8.100
4	1.188 (0.065)	5.471
8	2.083 (0.092)	4.417
10	2.971 (0.085)	2.861
$r = 0.994$	$I = 0.063$	$m = 0.277$

Promedio de los resultados obtenidos a partir de cuatro curvas de calibración de prazicuantel en plasma.

(EEM) = Error estándar medio

EVALUACION DE METODOS ANALITICOS PARA CUANTIFICAR
PRAZICUANTEL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

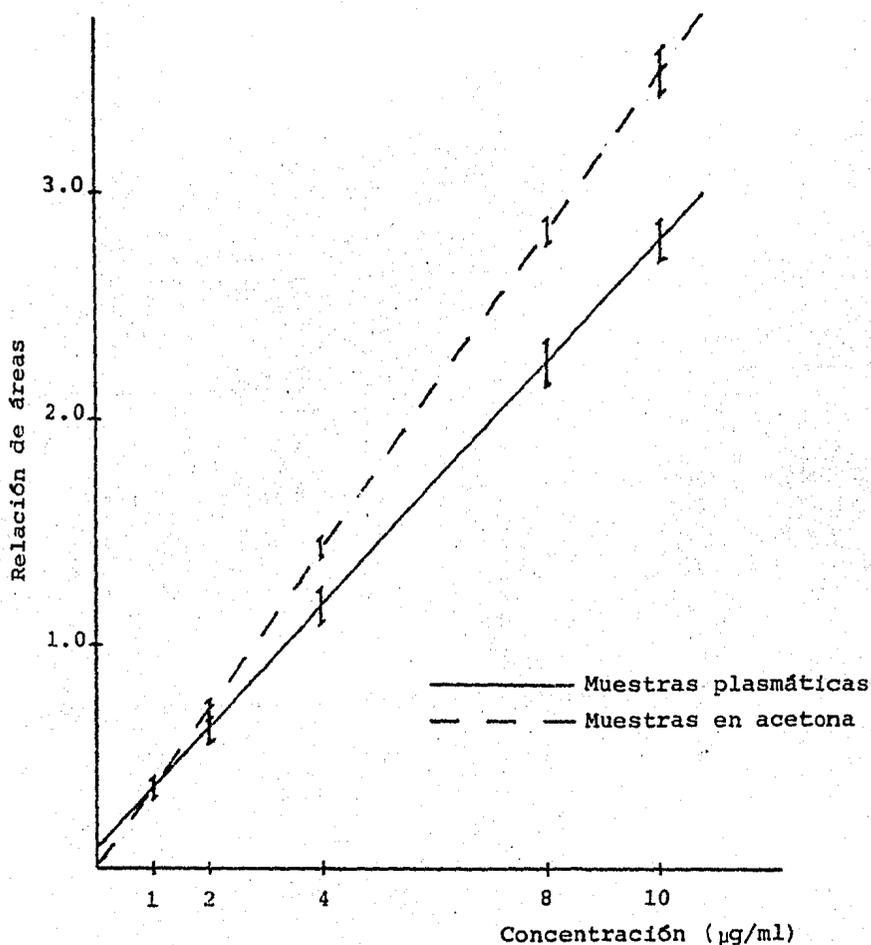


Figura 5. Gráfica promedio de la relación de áreas (prazicuanTEL/estándar) (\pm EEM) con respecto a la concentración de prazicuanTEL, utilizando cromatografía de líquidos. Castillo

1984.

EVALUACION DE METODOS ANALITICOS PARA CUANTIFICAR
PRAZICUANTEL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.

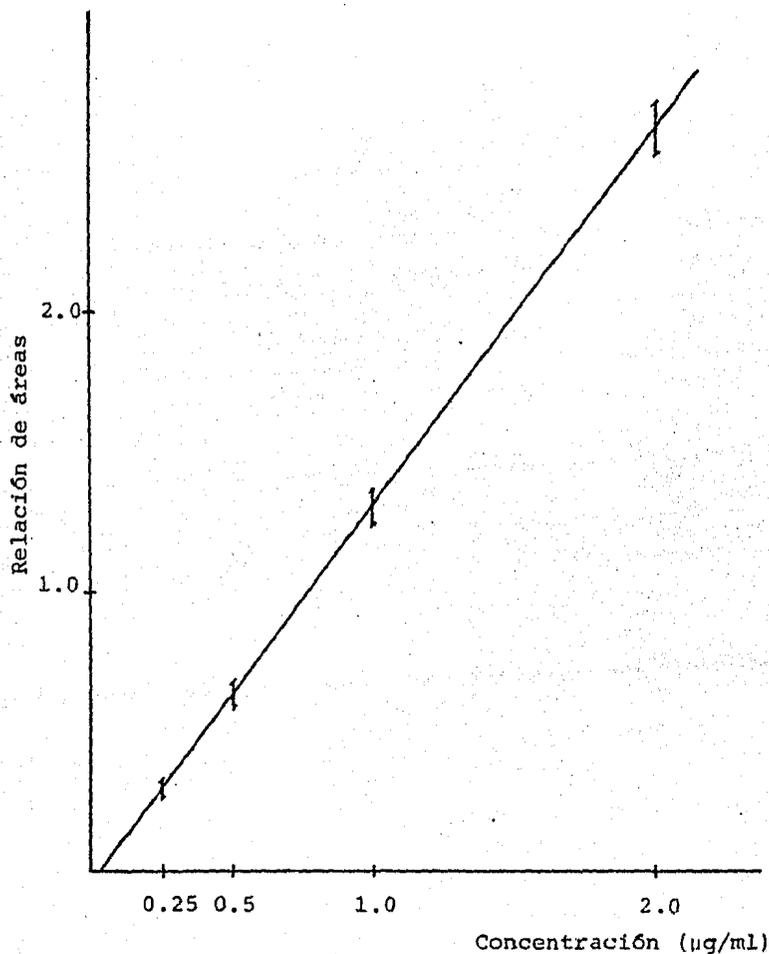


Figura 6. Gráfica promedio de la relación de áreas (prazicuanTEL/estándar) (\pm EEM) con respecto a la concentración de prazicuanTEL, empleando cromatografía de líquidos y estándar interno (tabla XI).

Castillo 1984.

2.2. Determinación de la Concentración Real y Porcentaje de Extracción de Prazicuantel en Plasma.

Se prepararon cuatro curvas de calibración de prazicuantel en acetona, en un intervalo de concentración de 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$, posteriormente se evaporó el solvente en baño maría. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla IX y gráficamente en la figura 5.

Tabla IX

Concentración de prazicuantel ($\mu\text{g/ml}$)	Relación de áreas prazicuantel/est. (EEM)	Coefficiente de variación estándar (%)
1	0.396 (0.020)	5.051
2	0.712 (0.017)	2.388
4	1.459 (0.034)	2.330
8	2.629 (0.057)	2.168
10	3.736 (0.097)	2.596
$r = 0.995$	$I = 0.004$	$m = 0.356$

Promedio de los resultados obtenidos a partir de cuatro curvas estándar de prazicuantel en acetona (EEM) = Error estándar medio.

Con el fin de calcular el rendimiento en la extracción se elaboró la tabla X, en la cual se presentan los datos obtenidos en el tratamiento de muestras plasmáticas y evaporadas.

Tabla X

Concentración de prazicuantel (µg/ml)	Promedio de mtas. plasmáticas	Promedio de mtas. evaporadas	Extracción (%)
1	0.348	0.396	87.878
2	0.642	0.712	90.168
4	1.188	1.459	81.426
8	2.083	2.629	79.232
10	2.971	3.736	79.524

Promedio = 83.646%

Error estándar medio = 2.257%

Rendimiento en la extracción de prazicuantel en plasma.

2.3. Coeficiente de Variación en la Extracción

El coeficiente de variación estándar en la extracción se determinó preparando por cuatuplicado cada una de las

concentraciones: 10, 8, 4, 2 y 1 $\mu\text{g/ml}$ de prazicuantel en plasma de acuerdo al esquema 2 (sección III.2.5.). Los resultados se muestran en la tabla VIII (sección IV.1.3.).

Los coeficientes de variación estándar de prazicuantel en plasma de 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ fueron grandes, por lo que se modificó la metodología de extracción utilizándose para concentraciones más pequeñas (tales como 0.25, 0.5, 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$) la reportada en el esquema 3 (sección III.2.5.).

Los resultados obtenidos al analizar por cuatuplicado cada concentración aparecen en la tabla XI.

Tabla XI

Concentración de prazicuantel ($\mu\text{g/ml}$)	Relación de áreas prazicuantel/est. (BEM)	Coefficiente de variación estándar (%)
0.25	0.260 (0.017)	6.538
0.5	0.642 (0.031)	4.829
1.0	1.263 (0.061)	4.830
2.0	2.726 (0.091)	3.338
$r = 0.9995$	$I = -0.089$	$m = 1.399$

Valores promedio de la relación de áreas obtenidas al analizar cuatro curvas de calibración de prazicuantel en plasma, agregando el estándar antes de la extracción del fármaco con solventes.

3. PRUEBAS DE ESTABILIDAD EN PLASMA

En el estudio de estabilidad de prazicuantel en plasma se analizaron muestras que se mantuvieron en congelación y protegidas de la luz a la 0, 1, 2, 3 y 4^a semana de su preparación (sección III.3.), los resultados obtenidos se encuentran en la tabla XII.

Tabla XII

Tiempo (semana)	Concentración de prazicuantel en plasma (µg/ml)				
0	10.494	12.055	11.005	10.966	10.560
1	10.571	11.209	11.240	10.977	11.621
2	10.517	10.252	11.415	10.717	10.725
3	10.040	10.912	10.815	11.249	11.004
4	11.287	10.690	10.842	11.228	10.803

Concentraciones plasmáticas de prazicuantel en el estudio de estabilidad. Las muestras se analizaron por cromatografía de líquidos bajo las condiciones indicadas en la sección III.2.6.

C A P I T U L O V

DISCUSION DE RESULTADOS

Linealidad

El método de cromatografía de gases utilizado para la cuantificación de prazicuantel en plasma, presentó una linea lidad satisfactoria en el intervalo de concentración de 1 a 8 $\mu\text{g/ml}$, con un coeficiente de correlación de 0.9965 (figura 3), el cual es estadísticamente significativo para el número de parejas de datos.

En la representación gráfica de los resultados obteni dos por cromatografía de líquidos (figura 5) utilizando es tándar externo muestran que estos datos se encuentran sobre una línea recta, el coeficiente de correlación (0.994) es un valor cercano a 1, indicando que el método empleado es lineal en el intervalo de concentración de 1 a 10 μg de prazicuan tel por ml de plasma.

El método de cromatografía de líquidos utilizando es tándar interno, presentó una linealidad satisfactoria en el intervalo de concentración de 0.25 a 2.0 μg de prazicuantel por ml de plasma, con un coeficiente de correlación de 0.9995 (figura 6).

Repetibilidad

En la tabla V (sección IV.1.1.) se presentan los valores promedio de relación de áreas, error estándar medio y coeficiente de variación estándar en el intervalo de concentración estudiado, para el método de cromatografía de gases en el cual se puede observar que el coeficiente de variación estándar más alto es de 5.948%.

Los valores obtenidos para cromatografía de líquidos utilizando estándar externo (tabla VIII) nos muestra que el coeficiente de variación estándar a concentraciones pequeñas es alto, lo cual nos indica que el método a 1 y 2 μg de prazicuantel por ml de plasma no es lo suficientemente preciso para estudios biofarmacéuticos y farmacocinéticos requeridos.

Con el fin de mejorar el coeficiente de variación, se modificó la metodología de extracción, utilizando estándar interno para el tratamiento de las muestras a concentraciones bajas de prazicuantel en plasma, en la tabla XI (sección IV.2.3.) se presentan los valores promedio de relación de áreas, error estándar medio y coeficiente de variación estándar en un intervalo de 0.25 a 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$; el coeficiente de variación estándar más alto es de 6.538%.

Todo lo anterior nos indica que los métodos se encuentran dentro de los límites de aceptación (coeficiente de variación estándar $\leq 10\%$).

Concentración mínima detectable

En el método de cromatografía de gases utilizado para la cuantificación de prazicuantel en plasma, se pudo detectar una concentración mínima de 0.5 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en cromatografía de líquidos una de 0.125 $\mu\text{g/ml}$.

Sensibilidad

Al analizar los resultados obtenidos en las pendientes de las gráficas (tablas V y XI) en cromatografía de gases (0.234) y líquidos (1:399) se pudo observar que la cuantificación de prazicuantel en plasma es seis veces más sensible en cromatografía de líquidos que en gases.

Selectividad

De acuerdo a los cromatogramas obtenidos (figuras 1 y 2, sección IV.1.), el método de cromatografía de gases presenta el problema de registrarse el colesterol presente en plasma, con un tiempo de retención muy cercano al del estándar, por esta razón se utilizó en el análisis de las muestras plasmáticas temperatura programada, mejorando así la resolución de estos dos compuestos.

En la figura 4 se presenta un cromatograma típico obtenido en el análisis de muestras, en el cual se puede observar, que en cromatografía de líquidos no se registran com-

puestos endógenos del plasma que interfieren en la determinación de prazicuantel.

Asimismo, se puede observar que en los cromatogramas correspondientes (figuras 1, 2 y 4) ambos métodos presentan gran selectividad.

Tiempo de análisis

El tiempo de análisis para las muestras en cromatografía de gases fué de 20 minutos, mientras que en cromatografía de líquidos fué de 10 minutos.

Rendimiento en la extracción

En las tablas VII y X (sección IV.1.2. y IV.2.2.) se presentan los resultados del rendimiento en la extracción de prazicuantel en plasma para cada concentración utilizando cromatografía de gases y líquidos respectivamente.

Una prueba de contraste de hipótesis para los promedios obtenidos en el rendimiento en la extracción (tabla XIII), nos indica con el 95% de confianza, que no existen diferencias en los resultados utilizando ambos métodos.

Tabla XIII

Método analí- tíco	% de recupera- ción (EEM)	t _{cal}	t _{tablas}
Cromatografía de gases	80.823 (2.007)	0.907	2.375
Cromatografía de líquidos	83.646 (2.257)		

Evaluación estadística del rendimiento en la extracción de prazicuantel en plasma utilizando cromatografía de gases y líquidos.

Con el fin de determinar si los métodos de cromatografía de gases y líquidos eran adecuados para estudios de regímenes de dosificación de prazicuantel en pacientes con cisticercosis cerebral, se trataron muestras plasmáticas obtenidas durante el tratamiento de estos enfermos. La cuantificación del fármaco se pudo realizar únicamente por cromatografía de líquidos ya que las concentraciones de prazicuantel en plasma fueron menores que la concentración mínima detectable en cromatografía de gases.

Fluorometría

Se realizaron determinaciones de prazicuantel en plasma utilizando el método de Pütter²⁷; debido al gran número de variables que interfieren en el proceso, no fué posible validar esta metodología analítica, observándose, por tanto, una irreproducibilidad de los resultados.

Pruebas de estabilidad en plasma

Para determinar la estabilidad de prazicuantel en plasma, en los resultados obtenidos de las muestras almacenadas durante cuatro semanas (tabla XII), se efectuó un análisis de varianza que se presenta en la tabla XIV, en la cual se puede observar que el valor calculado de F es menor que el valor de F en tablas, lo que indica que no existen diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de prazicuantel en plasma durante cuatro semanas.

Tabla XIV

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F _{cal}	F _{tab}
Entre semanas	4	0.654	0.163	0.237	2.87
Dentro de las semanas	20	13.820			
Total	24	14.474			

Análisis de varianza para concentraciones de prazicuantel en plasma obtenidas en diferentes semanas (estudio de estabilidad).

C A P I T U L O V I

CONCLUSIONES

En la evaluación de métodos analíticos para cuantificar prazicuantel en plasma se utilizaron fluorometría, cromatografía de gas-líquido y cromatografía de líquidos a alta presión.

Los parámetros que se tomaron en cuenta para desarrollar estos métodos fueron: linealidad (coeficiente de correlación), sensibilidad, repetibilidad (coeficiente de variación estándar), selectividad y concentración mínima detectable.

Se determinó que los métodos más aceptables en las condiciones de laboratorio, son cromatografía de gases y líquidos. Al comparar los resultados obtenidos en la cuantificación de prazicuantel en plasma utilizando los métodos anteriores, se observó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos en el intervalo de concentración de 1 a 8 $\mu\text{g/ml}$; sin embargo, a concentraciones más pequeñas existen problemas de sensibilidad en cromatografía de gases, por lo que se propone utilizar, en el análisis de muestras plasmáticas, un detector más específico como es el de ionización de flama alcalina, en donde el método de cromatografía de gas-líquido presentaría mayor sensibilidad que

el de líquidos a alta presión.

Con respecto al costo del análisis de las muestras, se determinó que es más económico, bajo las condiciones propuestas, trabajar con cromatografía de gases que con líquidos.

Asimismo, se encontró que prazicuantel en plasma, es estable durante cuatro semanas manteniéndose en congelación a -10°C y protegido de la luz.

Por otra parte, se probó la metodología de extracción de prazicuantel en plasma utilizando estándar interno y externo. Al comparar los resultados obtenidos se observó que el método presenta mayor repetibilidad si en la preparación de las muestras plasmáticas se trabaja con estándar interno.

En base a los resultados encontrados en este trabajo se sugiere para el desarrollo de estudios farmacocinéticos, de biodisponibilidad y bioequivalencia de prazicuantel en humanos se utilice el método de cromatografía de líquidos debido a su versatilidad, facilidad y rapidez.

CAPITULO VII

APENDICES

1. LISTA DE TABLAS

	Página
I. Diferentes regímenes de dosificación empleados para el tratamiento de <u>cis</u> ticercosis en algunos países donde existe esta enfermedad	9
II. Comparación de la toxicidad de <u>prazi</u> cuantel entre especies y diferentes vías de administración	14
III. Toxicidad de prazicuantel	15
IV. Distribución de radioactividad (en % de dosis de prazicuantel) en algu <u>nos</u> órganos de rata	19
V. Promedio de los resultados obtenidos a partir de cuatro curvas <u>están</u> dar de prazicuantel en plasma, analizadas en cromatógrafo de gases	43

Página

- VI. Promedio de los resultados obtenidos a partir de cuatro curvas estándar de prazicuantel en acetona, analizadas en cromatógrafo de gases 45
- VII. Rendimiento en la extracción de prazicuantel en plasma (cromatografía de gases) 46
- VIII. Promedio de los resultados obtenidos a partir de cuatro curvas de calibración de prazicuantel en plasma analizadas en cromatografía de líquidos 50
- IX. Promedio de los resultados obtenidos a partir de cuatro curvas de calibración de prazicuantel en acetona analizadas en cromatografía de líquidos 53
- X. Rendimiento en la extracción de prazicuantel en plasma (cromatografía de líquidos) 54
- XI. Valores promedio de la relación de áreas obtenidas al analizar cuatro cur-

Página

vas de calibración de prazicuantel en plasma, agregando el estándar interno antes de la extracción del fármaco con solventes	55
XII. Concentración plasmática de prazicuantel en el estudio de estabilidad	56
XIII. Evaluación estadística del rendimiento en la extracción de prazicuantel en plasma utilizando <u> cromatografía de gases y líquidos</u>	61
XIV. Análisis de varianza para concentraciones de prazicuantel en plasma obtenidas a diferentes semanas (estudio de estabilidad)	63

2. LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Cromatogramas obtenidos al analizar muestras plasmáticas utilizando cromatografía de gases a temperatura constante	41
2. Cromatogramas obtenidos al analizar muestras plasmáticas utilizando cromatografía de gases a temperatura programada	42
3. Gráfica promedio de la relación de áreas (prazicuantel/estándar) (\pm EEM) con respecto a la concentración de prazicuantel, empleando cromatografía de gases	44
4. Cromatogramas obtenidos al analizar muestras plasmáticas utilizando cromatografía de líquidos a alta presión	49

5. Gráfica promedio de la relación de áreas (prazicuantel/estándar) (\pm EEM) con respecto a la concentración de prazicuantel, empleando cromatografía de líquidos y estándar externo 51
6. Gráfica promedio de la relación de áreas (prazicuantel/estándar) (\pm EEM) con respecto a la concentración de prazicuantel, empleando cromatografía de líquidos y estándar interno 52

3. LISTA DE ESQUEMAS

1. Técnica empleada para la extracción de prazicuantel en plasma (muestras analizadas en cromatografía de gases) 31
2. Técnica empleada para la extracción de prazicuantel en plasma (concentración de las muestras: 10, 8, 4, 2 y 1 μ g/ml, analizadas en

cromatografía de líquidos)

36

3. Técnica empleada para la extracción de prazicuantel en plasma (concentración de las muestras: 2, 1, 0.5 y 0.25 $\mu\text{g/ml}$, analizadas en cromatografía de líquidos)

37

C A P I T U L O V I I I

BIBLIOGRAFIA

- (1) Andrews P., Annals of Tropical Medicine and Parasitology 74, 167 (1980).
- (2) Andrews P., Arzneim-Forsch/Drug Res. 31, 538 (1981).
- (3) Biagi F., y Márquez H., Gaceta Médica de México 103, 230, (1982).
- (4) Billings C. P. and Heidelberg C., Cancer Research 42, 2692, (1982).
- (5) Botero & Castaño, American Journal Trop. Med. Hyg. 31, 810, (1982).
- (6) Brossi A., Heterocycles 11, 521 (1978).
- (7) Chavarría M., Díaz G. D., Especialidades Verinarias 1, 160 (1979).
- (8) Chubb J. M., Journal of Pharmacol. and Exp. Therap., 207, 284 (1978).

- (9) Col O. y Sauz M., *Salud Pública de México* 25, 201 (1982).
- (10) Coles G. C., *Journal of Helminthology* 53, 31 (1979).
- (11) Davis A. & Wegner D., *Bulletin of the World Health Organization* 57, 767 (1979).
- (12) Davis A. & Biles J.E. *Bulletin of the World Health Organization* 57, 773 (1979).
- (13) Diekman H.W., *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* No. 2, 107 (1976).
- (14) Diekman H.W., *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics* No. 3, 139 (1979).
- (15) Frohberg H. & Schulze M., *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 31, 555 (1981).
- (16) Frohberg H., *Salud Pública de México* 24, 605 (1982).
- (17) Galindo V., *Salud Pública de México* 24, 679 (1982).
- (18) Gemell M. A., *Research in veterinary Science* 29, 131 (1980).

- (19) Ghetaldi L. D., *Annals of Internal Medicine* 99, 179 (1983).
- (20) González B. D. y Vega V. A., *Revista de Investigación en Salud Pública* 32, 1 (1972).
- (21) Groll Erhard, *Boletín Chileno de Parasitología* 36, 29 (1981).
- (22) Han-Jong Rim, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 75, 27 (1981).
- (23) Ishizaki T., *Bulletin of the World Health Organization* 57, 787 (1979).
- (24) Katz N., *Bulletin of the World Health Organization* 57, 781 (1979).
- (25) Kim A. R., *Journal of Parasitology* 67, 20 (1981).
- (26) Köhler P. & Bachmann R., *Molecular Pharmacology* 14, 155 (1978).
- (27) León Chapa S., *Hipersensibilidad celular en cisticercosis experimental. Tesis Profesional (Químico Farma-*

macéutico Biólogo). Facultad de Química U.N.A.M.
(1981). México, D.F.

- (28) Leopold G., European Journal of Chemical Pharmacology 14, 281 (1978).
- (29) Lombardo L., Gaceta Médica de México 118, 1 (1982).
- (30) Mader E. E. J., Pharmacological and Chemical Synonyms pág. 407, Excerpta Médica, 7^a Edition (1983).
- (31) Marshall I., Annals of Tropical Medicine and Parasitology 75, 115 (1982).
- (32) Mazzotti L. y Treviño A., Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales 13, 208 (1953).
- (33) Patzchke K. & Pütter J., European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics No. 3, 149 (1979).
- (34) Pellegrin J. & Lima Costa F., Z. Parasitenk. 52, 151 (1977).
- (35) Pintip R., Life Sciences 32, 2529 (1983).

- (36) Pütter J., European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics No. 4, 193 (1978).
- (37) Pütter J., European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics No.3, 143 (1979).
- (38) Robles C. y Chavarría M., Gaceta Médica de México 116, 65 (1980).
- (39) Robles C., Salud Pública de México 24, 599 (1982).
- (40) Robles C., Gaceta Médica Mexicana 117, 356 (1982).
- (41) Santos A. T., Bulletin of the World Health Organization 57, 793 (1979).
- (42) Seubert J. & Loebich P., Experientia 13, 1036 (1977).
- (43) Shua-Xua Xiao, Journal of Chromatography 275, 127 (1983).
- (44) Slomianski R., Información Científica y Tecnológica 4, 31 (1982).
- (45) Steiner K. & Garles A., European Journal of Drug Me-

- tabolism and Pharmacokinetics No.2, 85 (1976).
- (46) Steiner K., European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics No.2, 97 (1976)
- (47) Takur S. A., Experimental Parasitology 47, 131 (1979).
- (48) Terada M. Experientia 38, 349 (1982).
- (49) Thomas H., Boletín Chileno de Parasitología 32, 2 (1977).
- (50) Thomas H. & Gönner R., Research in Veterinary Science 24, 20 (1978).
- (51) Thomas H. & Andrews P., Tropenmed. Parasit. 30, 391 (1979).
- (52) Thomas H., Am. J. Trop. Med. Hyg. 31, 4 (1982).
- (53) Trujillo V. V. y González B. D., Archivos de Investigación Médica 12, 15 (1981).
- (54) Tumada L. R. & Margeno Sri S., Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Hlth. 4, 371 (1973).

- (55) Xiao Shuhua, *Acta Pharmacologica Sinica* 2, 141
(1981).