

N.º 108
2.E.I.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO PARA CUANTIFICAR PRAZICUANTEL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS

T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO
B I O L Ó G O
Q U E P R E S E N T A :
CYNTHIA ALICIA MORANO OKUNO



MEXICO, D. F.

1992

FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

II.2.4. - Programadores de Fase Móvil.	25
II.2.5. - Registradores.	25
II.2.6. - Controladores de Temperatura.	26
II.2.7. - Recolectores de Fracciones.	27
II.2.8. - Medición de Flujos.	27
II.2.9. - Columnas y Fases Estacionarias.	28
II.2.9.1. - Características generales.	28
II.2.9.2. - Fases estacionarias.	29
II.2.10. - Detectores.	30
II.2.10.1. - Detector de índice de refracción.	30
II.2.10.2. - Detector de luz ultravioleta.	31
II.2.10.3. - Detector de fluorescencia.	32
II.2.10.4. - Detector electroquímico.	32
II.2.10.5. - Detector de diodos.	32
II.3. - Importancia de Métodos Analíticos en Estudios de Farmacocinética y Metabolismo.	33
II.3.1. - Tratamiento de muestras.	34
II.3.2. - Propiedades particulares del plasma.	36
II.3.3. - Propiedades particulares de la orina.	37
III. PARTE EXPERIMENTAL.	38
III.1. - Determinación de Prazicuantel en Plasma y en Orina.	38
III.1.1. - Material y equipo.	38
III.1.2. - Reactivos.	38
III.1.3. - Soluciones.	39
III.1.4. - Preparación de las soluciones.	39

III.2. - Desarrollo del Método.	40
III.2.1. - Método de extracción.	40
III.2.2. - Condiciones cromatográficas.	43
III.3. - Validación del Método Analítico.	43
III.3.1. - Linealidad.	43
III.3.2. - Repetibilidad.	43
III.3.3. - Exactitud del método analítico.	44
III.3.4. - Concentración mínima detectable.	44
III.3.5. - Selectividad.	45
III.3.6. - Tolerancia del Método analítico.	45
III.3.6. - Estabilidad.	45
IV. RESULTADOS.	
IV.1. - Determinación de Prazicuantel en Plasma y en Orina por CLAR.	46
IV.2. - Parámetros validados.	46
V. ANALISIS DE RESULTADOS.	
V.1. - Validación del Método Analítico para la Cuantificación de Prazicuantel en Plasma.	67
V.2. - Validación del Método Analítico para la Cuantificación de Prazicuantel en Orina.	74
V.3. - Comparación entre el Tratamiento de Muestras Plasmáticas y de Orina.	80
VI. CONCLUSIONES.	81
VII. BIBLIOGRAFIA.	83

INDICE DE TABLAS

TABLA		PAGINA
I.-	Linearidad del método analítico en Plasma.	48
II.-	Linearidad del método analítico en Orina.	50
III.-	Repetibilidad 1 ^{er} día en plasma.	52
IV.-	Repetibilidad 2 ^{do} día en plasma.	53
V.-	Repetibilidad en diferentes días en plasma.	53
VI.-	Repetibilidad 1 ^{er} día en orina.	54
VII.-	Repetibilidad 2 ^{do} día en orina.	54
VIII.-	Repetibilidad en diferentes días en orina.	55
IX.-	Exactitud del método analítico en plasma.	56
X.-	Exactitud del método analítico en orina.	56
XI.-	Valores para la gráfica de conc. adicionada vs. conc. recuperada, en plasma.	57
XII.-	Valores para la gráfica de conc. adicionada va. conc. recuperada, en orina.	57
XIII.-	Influencia de la fase móvil sobre el método analítico, en plasma y en orina.	65
XIV.-	Estabilidad de muestras de plasma y de orina.	66
XV.-	Análisis de varianza para la repetibilidad en plasma.	69
XVI.-	Intervalo de confianza para estabilidad en plasma. Refrigeración y congelación.	72
XVII.-	Factor I para estabilidad en plasma. Refrigeración y congelación.	73
XVIII.-	Análisis de varianza para repetibilidad en orina.	75
XX.-	Intervalo de confianza y factor I para estabilidad en orina. Refrigeración.	78
XXI.-	Intervalo de confianza y factor I para estabilidad en orina. Congelación.	79

INDICE DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1.- Grupos importantes en la estructura del Prazicuantel.	6
2.- Instrumental de CLAR.	23
3.- Método analítico utilizado en la cuantificación del Prazicuantel en plasma y en orina.	42
4.- Cromatogramas típicos del Prazicuantel y estándar interno en plasma y orina.	47
5.- Gráfica de linealidad del método en plasma.	49
6.- Gráfica de linealidad del método en orina.	51
7.- Gráfica de concentración adicionada vs. concentración recuperada en plasma.	58
8.- Gráfica de concentración adicionada vs. concentración recuperada en orina.	59
9.- Cromatogramas de concentración mínima detectable en plasma y orina.	61
10.- Cromatogramas de plasma blanco y plasma adicionado con Prazicuantel.	62
11.- Cromatogramas de orina blanco y orina adicionada con Prazicuantel.	63

CAPITULO I
INTRODUCCION Y OBJETIVOS

La cisticercosis es una enfermedad provocada por la presencia en el organismo humano de *Cysticercus cellulosae* y *Cysticercus racemosus*, formas larvarias de la *Taenia solium*, gusano parásito del intestino del hombre.

El portador de la *Taenia solium* o solitaria siempre es el ser humano y es considerado el principal factor de transmisión de la cisticercosis. El cerdo cisticercoso participa en la transmisión por ser el portador de cisticercos capaces de transformarse en solitarias, si el hombre ingiere carnes contaminadas insuficientemente cocidas.

Cuando el parásito llega al estómago, los huevos dejan en libertad a los embriones, los cuales son diseminados a todo el organismo, penetrando la pared intestinal y alcanzando el sistema circulatorio. Las larvas se desarrollan en cualquier tejido blando, incluyendo piel, tejido subcutáneo, músculo, cerebro, hígado, corazón, pulmón, riñón, ojos; sin embargo los órganos más frecuentemente atacados son el cerebro y el ojo, donde los trastornos suelen ser más graves. (1)

La sintomatología de la neurocisticercosis en el hombre aparece en un tiempo variable, inclusive años después de la ingestión de los huevecillos. Tiene un amplio espectro de

manifestaciones clínicas, desde ser asintomática hasta presentar cuadros neurológicos graves. Una proporción significativa de los enfermos sintomáticos, presenta manifestaciones neurológicas como cefalea y con menos frecuencia convulsiones, muchas veces controladas con medicamentos. La otra fracción presenta cuadros epilépticos mas severos, hipertensión endocraneal, encefalitis y/o meningitis, con curso clínico de deterioro progresivo, que puede requerir hospitalización y en algunos casos cirugía.

Las lesiones producidas por los cisticercos se deben a la reacción de los tejidos circundantes y a las lesiones mecánicas producidas por el crecimiento de los cisticercos, que ocupan un determinado espacio y comprimen estructuras vecinas, impidiendo el libre flujo de líquido cefalorraquídeo y/o porque induce fenómenos inflamatorios en el tejido nervioso, en las meninges y en los vasos sanguíneos del cráneo y del raquis, provocando anemia y posteriormente destrucción del territorio irrigado por ellas. (1)

La *Taenia solium* se encuentra principalmente en países de Latinoamérica, Africa y Asia. La incidencia de estos parásitos es variable y está relacionada con factores socioculturales y económicos.

Ya que la cisticercosis es la enfermedad mas común del sistema nervioso central, está considerada como un problema médico, veterinario y de salud pública.

El Prazicuantel, es derivado isoquinolinico, que ha sido utilizado con buenos resultados para el tratamiento de la neurocisticercosis a partir del año de 1980. Entre las ventajas que presenta este fármaco se encuentran su elevada eficacia, baja toxicidad y un corto regimen de tratamiento. A pesar de su amplio uso existe poca información acerca de su farmacocinética, biodisponibilidad y metabolismo, así como de métodos analíticos sensibles y específicos para cuantificar este fármaco en fluidos biológicos, por lo cual se realizó el presente trabajo cuyos objetivos fueron:

Desarrollar un método analítico, por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), para la cuantificación de Prazicuantel en fluidos biológicos (plasma y orina), para su posterior empleo en estudios de farmacocinética, monitoreo, biodisponibilidad y toxicología.

Validar el método desarrollado tomando en cuenta los parámetros de: linealidad, sensibilidad, repetibilidad, especificidad, exactitud, concentración mínima detectable y tolerancia.

CAPITULO II GENERALIDADES

II.1- MONOGRAFIA DEL PRAZICUANTEL.

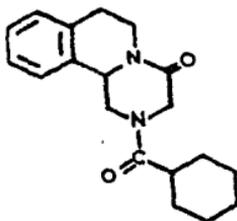
II.1.1. - PROPIEDADES FISICOQUIMICAS.

NOMBRE QUIMICO: 2-(ciclohexil carbonil)-1,3,6,7,11b-hexahidro-4H- pirazino [2,1-a] isoquinolin-4-ona. (43)

SINONIMOS: Prazicuantel, Droncit, Piquitón, Embay 8440, Biltricide, Cesol, Cisticide, Cestox. (30)

FORMULA CONDENSADA: $C_{19}H_{24}N_2O_2$. (43)

FORMULA DESARROLLADA:



COMPOSICION PORCENTUAL: Carbono 73.05%, Hidrógeno 7.74%, Oxígeno 10.24%, Nitrógeno 8.97%.

PESO MOLECULAR: 312.42. (43)

APARIENCIA FISICA: Sólido cristalino, de color blanco o casi blanco, inodoro o con un olor débil característico, posee un sabor amargo, es inestable a la luz y es higroscópico. (49)

ALMACENAMIENTO: Guardarlo en recipientes bien cerrados, protegido de la luz. (33)

SOLUBILIDAD: Soluble en la mayoría de los solventes orgánicos (9.7 g/100 ml de etanol, 58.7 g/100 ml de cloroformo a 25°C), muy

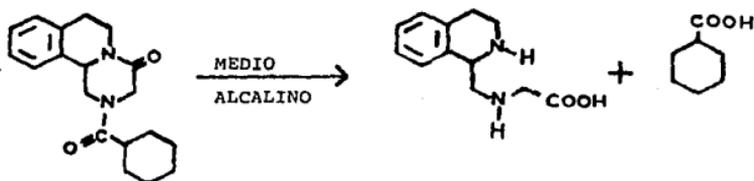
soluble en dimetilsulfóxido y escasamente soluble en agua (0.04 g/100 ml a 25°C). (43) (49)

PUNTO DE FUSION: 136-139°C (descomposición). (43)

COEFICIENTE DE PARTICION: Una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos (pH= 7.0) y ciclohexano, da un valor de 14.86. Para la misma solución amortiguadora y n-hexano es de 38.62. Utilizando ácidos fuertes como el ácido sulfúrico (5-10N) y ácido clorhídrico 8N el Prazicuantel puede ser extraído cuantitativamente del ciclohexano. (38)

ESTABILIDAD EN SOLUCION: En soluciones neutras o débilmente ácidas o alcalinas, la concentración del Prazicuantel disminuye en una proporción menor al 2%, durante 16 hrs. a temperatura ambiente.

El Prazicuantel puede sufrir hidrólisis en un medio fuertemente alcalino formando:



En plasma, a temperatura ambiente, el Prazicuantel se degrada en un 5% después de 16 hrs. Cuando una solución en plasma u orina se almacena a -60°C, durante 4 semanas no se observa disminución en la concentración del fármaco. (38)

II.1.2. - PROPIEDADES FARMACOLOGICAS.

El Prazicuantel es una mezcla racémica que presenta una alta efectividad contra todas las especies *Schistosoma* que infectan al hombre, además de otros parásitos, incluyendo la larva de la *Taenia solium*, que produce la cisticercosis. (37)

El Prazicuantel es el que presenta la actividad farmacológica, sus metabolitos hidroxilados y conjugados tienen una actividad muy pequeña o nula. La actividad antihelmíntica de esta molécula está relacionada con el pirazino [2,1-a] isoquinolina, mientras que su amplio espectro parece ser dependiente de un grupo oxo en la posición 4 y un acil o tioacil en la posición 2 (26). En la figura 1 se presenta el Prazicuantel con sus posiciones activas.

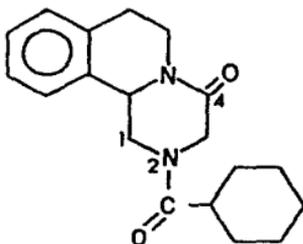


FIGURA 1. Grupos importantes en la estructura del Prazicuantel.

En un estudio en 2 grupos de pacientes con *Schistosoma japonica*, se administró a un grupo una dosis de (20 mg/kg) de levo-prazicuantel y al 2do grupo (40 mg/kg) de prazicuantel. A los 4 y 6 meses después del tratamiento, se observó que no había

diferencia estadística entre los dos tratamientos, además de que el levo-prazicuantel presentó efectos colaterales menores a los del Prazicuantel. (52)

Considerando que la dosis administrada al 2do grupo es el doble de la del 1er grupo, se concluyó que la actividad antiparasitaria se manifiesta solo en el isómero (-) con su configuración R. (52)

II.1.2.1. MECANISMO DE ACCION.

El mecanismo de acción del prazicuantel no ha sido bien caracterizado, se postula que el prazicuantel incrementa la permeabilidad de la membrana del parásito, resultando en la pérdida del calcio intracelular y por consiguiente la contracción y parálisis de la musculatura. (37)

El prazicuantel se introduce rápidamente en los esquistosomas y otros gusanos adultos, y parece ser que se distribuye a través de los mismos. (37)

El prazicuantel produce una intensa vacuolización en muchos lugares del tegumento de los esquistosomas adultos. En el caso de *Schistosoma mansoni*, este efecto es seguido por el ataque de fagocitos al parásito y por último la muerte. (37)

La evidencia experimental sugiere que la eliminación del parásito in vivo puede requerir de eventos inmunológicos adicionales dependientes del hospedero. El tratamiento con el fármaco a ratones con deficiencias en las células T, infectados con *S. mansoni*, mostró ser menos efectiva que la terapia en ratones inmunológicamente intactos. Ratones sin células B

respondieron a la terapia con prazicuantel con una reducción insignificante del 17% de los gusanos, en contraste con el 65 al 80% de reducción en animales inmunológicamente intactos. (26)

II.1.2.2.- ABSORCION.

Después de una administración oral, el Prazicuantel se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal. En algunas especies estudiadas por Steiner, se determinaron las cantidades del fármaco absorbido después de una administración oral en relación a una administración intravenosa obteniéndose los siguientes resultados:

Especie	Porcentaje absorbido
- Ratas Wistar	77
- Perro Beagle	90
- Mono Rhesus	75
- Oveja	100

Las concentraciones plasmáticas máximas de Prazicuantel y sus metabolitos se alcanzaron en un tiempo de 60 minutos. (45)

En estudios realizados *in situ* en ratas, se encontró que en un lapso de 6 horas se absorbió en el estómago menos de la mitad de la dosis de Prazicuantel (45) (47). Xiao (53), reporta que el fármaco se absorbe en una proporción mayor en duodeno e ileon.

En sujetos sanos la absorción enteral de Prazicuantel es del 80% de la dosis administrada observándose que el tiempo en que alcanza la concentración plasmática máxima del fármaco se encuentra entre 1 y 3 horas. (10) (28)

Estudios realizados en el Instituto Nacional de Neurología indican que el Prazicuantel es rápidamente absorbido después de una administración oral cuando se administra en una tableta convencional, con una vida media de absorción de 0.88 hrs. Los niveles plasmáticos máximos obtenidos se encontraron entre 1.5 a 2.0 hrs. Los valores de C_{max} oscilaron entre 3.9 a 8.9 $\mu g/ml$. (24) (50)

P.R.M Bittencourt y col., (4) encontraron que la concentración máxima en suero se presenta entre 1 y 2 hrs. después de la administración oral. La elevada liposolubilidad del Prazicuantel y sus características cinéticas originan una considerable disminución de la concentración de Prazicuantel en suero después de 4 hrs. de la administración. Al cuadruplicar la dosis oral, los niveles en suero se incrementan 8 veces, indicando una saturación hepática.

II.1.2.3.- DISTRIBUCION.

Steiner y col. (48), estudiaron la distribución del Prazicuantel marcado con ^{14}C , después de la administración tanto de dosis únicas como múltiples por vía intravenosa y oral en ratas wistar, observando que el Prazicuantel se distribuye rápidamente en todos los tejidos del organismo, principalmente en hígado y riñón. Cuando el Prazicuantel se administró en dosis repetidas se encontró una ligera acumulación del fármaco en casi todos los órganos analizados.

La comparación de los valores de Prazicuantel en plasma, riñón, hígado y cerebro muestra claramente que solo pequeñas

cantidades de fármaco llegan al cerebro, esto es de un octavo a un tercio de las cantidades en plasma (16). Resultados similares fueron encontrados por Andrews, quien investigó la penetración del Prazicuantel a través de la barrera hematoencefálica en ratas. La concentración en líquido cefalorraquídeo fué de un quinto a un séptimo de la proporción de Prazicuantel libre y unido a proteínas plasmáticas. (17)

Otros estudios han demostrado que el Prazicuantel penetra en un 24% aproximadamente a líquido cefalorraquídeo en pacientes con cisticercosis. (23)

A. Spina Franca y col. (44), encontraron que existe una correlación entre los niveles de Prazicuantel en líquido cefalorraquídeo (LC) y en suero, siendo muy similares a los encontrados de la fracción de fármaco libre en suero.

Después de la administración intravenosa de ¹⁴C-Prazicuantel se encontró que cerca del 10% de la dosis administrada se secreta hacia el tracto gastrointestinal en un lapso de una hora. (45)

Investigaciones acerca del paso del Prazicuantel a través de la placenta, mostraron que 24 horas después de una administración intravenosa, el 0.3% de la dosis llegaba al feto, lo cual indica que el fármaco atravieza con dificultad la barrera placentaria. (46)

Un estudio realizado en 10 mujeres lactantes demostró que las concentraciones plasmáticas eran 4 veces mayores que la encontrada en leche materna (39). Los valores promedio de las concentraciones plasmáticas se encontraban en el rango de 0.048 a 1.319 $\mu\text{g/ml}$ y de 5.25 h $\mu\text{g ml}^{-1}$; y para dosis de 20 mg/kg cada cuatro horas fueron

de 1.02 $\mu\text{g/ml}$ y de 13.8 h $\mu\text{g ml}^{-1}$, en leche y en sangre respectivamente.

Los volúmenes aparentes de distribución son relativamente grandes (6.7-10 l/kg), lo cual se debe probablemente a la lipofilicidad del Prazicuantel. (24)

Xiao Shu-hua y col. (54) reportaron que el Prazicuantel al ser expuesto a *S. japonicum* penetra rápidamente tanto a hembras como a machos y se difunde del gusano cuando la concentración a su alrededor decrece, por lo que sugieren que la cantidad de Prazicuantel que penetra a *S. japonicum* es dependiente de la concentración del fármaco en el plasma o en el medio *in vitro*.

II.1.2.4.- METABOLISMO.

Diekman y col. (11), estudiaron el metabolismo del Prazicuantel en diferentes especies animales, encontrando que 30 min después de la administración oral, solo el 1% de la cantidad total se encuentra en plasma como fármaco inalterado. En contraste con esto, cantidades substanciales de Prazicuantel se encuentran en el suero por un periodo más prolongado después de una administración intravenosa.

Por tanto, la cantidad de fármaco inalterado en suero depende de la vía de administración, lo cual indica que existe un intenso efecto del primer paso después de la administración oral.

El efecto del primer paso varía entre especies, siendo más prominente en ratas wistar y en mono rhesus. Sin embargo, se

observo que no hay diferencias cualitativas en los metabolitos utilizando diferentes vias de administración. (13) (17)

En ratones parasitados con *Schistosoma mansoni* se observa una reducida capacidad de biotransformación en el hígado, con respecto a animales sanos, lo cual provoca que el Prazicuantel permanezca mas tiempo en la sangre de los ratones infestados, aumentando así el tiempo de vida media. (2)

En individuos sanos se encontró que 4 horas después de la administración de una dosis oral de Prazicuantel marcado, la cantidad de fármaco inalterado en plasma es cerca de 5% de la radioactividad total. (5)

Leopold y col. (28), estudiaron el metabolismo del Prazicuantel en humanos, después de dosis orales de 5, 10, 20 y 50 mg/kg y observaron que el efecto del primer paso es mayor a dosis mas pequeñas, es decir, existe una dosis-dependencia del metabolismo en cuanto a capacidad.

La mayoría de los metabolitos aislados de suero y orina de personas sanas son predominantemente productos hidroxilados del Prazicuantel, conteniendo uno o dos grupos hidroxilo. En suero se encuentran en mayor proporción los metabolitos monohidroxilados mientras que en orina predominan los metabolitos con dos grupos hidroxilo. (5)

Los metabolitos urinarios en hombres y mujeres después de la administración de 14 y 44 mg/kg son esencialmente iguales lo cual indica que el metabolismo del Prazicuantel no está influenciado

por el sexo y es independiente de la dosis dentro del rango de dosis estudiada. (5)

Mohammed Hag Ali y col. (20), identificaron 17 metabolitos hidroxilados del Prazicuantel de muestras de orina purificada de ratón, incluyendo 3 monohidroxilados, 6 dihidroxilados y 8 trihidroxilados. No se encontraron diferencias entre los metabolitos producidos por animales sanos y animales infectados con *Schistosoma mansoni*.

H. Jung y col., demostraron que los niveles plasmáticos de Prazicuantel se reducen aproximadamente en un 50% cuando se administra simultáneamente con dexametasona, lo cual puede deberse a la interacción metabólica. (23)

M. H. Mostafa y col., (35) investigaron la modificación de las enzimas microsomales monooxigenasas de ratón (citocromo P-450, NADPH-citocromo c reductasa y la aril hidrocarbano hidroxilasa (AHH)). La administración de Prazicuantel disminuyó el contenido del citocromo P-450, y la actividad de la AHH solo in vivo, mientras que la NADPH-citocromo c reductasa no fue alterada, por lo que concluyeron que el Prazicuantel tiene la habilidad de alterar la actividad de las enzimas que metabolizan los fármacos.

Lisette Van Lieshout y col., (29) demostraron que el antígeno circulante anódico (ACA) en suero y en orina tiene un fuerte potencial en el diagnóstico de la esquistosomiasis, ya que día a día durante las fluctuaciones de la infección activa, los ACA pueden ser usados para indicar la eficacia de la terapia después

del tratamiento con Prazicuantel en pacientes infectados con *S. japonicum* y *S. haematobium*. En su estudio, el antígeno se encontró en un 81% en pacientes con esquistosomiasis intestinal y en un 97% en aquellos con esquistosomiasis urinario. En 17 pacientes egipcios sin infección esquistosómica no se encontraron ACA. Después del tratamiento con Prazicuantel (60 mg/kg), la concentración de ACA decreció significativamente tanto en suero como en orina.

II.1.2.5.- ELIMINACION.

El Prazicuantel se elimina rápidamente del organismo en forma de sus metabolitos, predominantemente por vía renal en rata, perro, mono, humano. El fármaco inalterado solo se encuentra de un 0.0001 a un 0.001% en orina en un periodo de 24 horas (28). La eliminación fecal es de menor importancia en todas las especies estudiadas. (13) (17)

En el hombre en cuatro días se elimina el 80% de la dosis y de ella más del 90% se elimina durante el primer día. (10)

El tiempo de vida media determinado en humanos sanos es de 1-1.5 horas para fármaco inalterado y de 4-5 horas para fármaco total. Esto demuestra que aunque el Prazicuantel es rápidamente captado por los tejidos, su eliminación es muy rápida. (10) (17) (28) (36)

Otros estudios han demostrado que el Prazicuantel se ajusta a un modelo abierto de un compartimento después de una administración de primer orden. (36) (24) (50)

En conejos, se encontró que el tiempo de vida media después

de una administración oral es de 0.6 horas y después de una dosis intravenosa es de 0.25 horas, ajustandose a un modelo abierto de dos compartimentos. (18)

II.1.2.6.- TOXICIDAD Y REACCIONES ADVERSAS.

Estudios de toxicidad aguda demuestran que la DL₅₀ del Prazicuantel en ratas, ratones y conejos varía dependiendo de la vía de administración usada, en el rango de 795 a 16000 mg/kg. La toxicidad aguda en perros no pudo ser evaluada debido al efecto emético del Prazicuantel a dosis altas. (2)

Después de la administración oral múltiple del Prazicuantel, las ratas toleran dosis hasta de 1000 mg/kg durante cuatro semanas y los perros hasta de 180 mg/kg durante 13 semanas sin desarrollar ningún tipo de lesión orgánica. (7)

Con respecto a la toxicidad del Prazicuantel en la reproducción, no tuvo efectos embriotóxicos ni teratogénicos en ratas y conejos, aun cuando se presentaron algunos efectos tóxicos en la madre, como salivación y diarrea. (7)

En ratas, dosis de 30, 100, y 300 mg/kg, de este fármaco no presentan efecto alguno sobre la fertilidad del macho o de la hembra; tampoco se observan sobre el cigoto, su transportación, implantación y desarrollo, ni en el parto, el recién nacido, la lactancia, el destete y el desarrollo postnatal del producto, ni en la capacidad reproductiva de la generación F¹ y la generación F². (7)

Amplias investigaciones de mutagenicidad realizadas por

diferentes autores en diversos sistemas experimentales, no muestran evidencia de que el Prazicuantel induzca mutaciones puntuales, conversión de genes, reposición de RNA, intercambios de cromátides hermanas, y mutaciones letales recesivas ligadas al cromosoma X. (7)

El Prazicuantel tampoco ejerce efectos mutagénicos en distintos experimentos *in vivo* en mamíferos (3) (10), sin embargo, existen algunos investigadores que indican que el Prazicuantel si tiene actividad mutagénica. (14) (42)

Billings (3), Feng (14) y Seed (42), encontraron que el Prazicuantel en bacterias y células animales a concentración de 50 $\mu\text{g/ml}$ actúa como comutágeno en presencia de sustancias mutagénicas, y que probablemente también sea carcinógeno.

En pruebas combinadas de carcinogenicidad y toxicidad crónica efectuadas en ratas por espacio de 2.5 años y en *Cricetos* sirios por 80 semanas, demuestran que el Prazicuantel no es carcinogénico y que presenta baja toxicidad. (7) (45)

Se ha reportado que este fármaco no produce irritación de mucosas (mucosa ocular de conejo), ni en la piel (humanos y cuyos). (8)

Se ha estudiado la tolerancia del Prazicuantel en pacientes con *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* y *S. haematobium*, observando que no se presentan alteraciones en las pruebas bioquímicas y hematológicas, ni en los electrocardiogramas, después de la administración prolongada del Prazicuantel a dosis de 20, 40, 50 y 80 mg/kg. (10) (22) (25) (41) (51)

En el tratamiento de la neurocisticercosis en humanos con 50 mg/kg de Prazicuantel, Robles (40) observó algunos efectos secundarios como cefaleas, vómito, urticaria, agresividad, depresión mental, mareos e hiperglicemia, los cuales desaparecían al suspender el tratamiento.

La administración del Prazicuantel a personas sanas no provoca cambios en las pruebas de laboratorio ni en los exámenes neurológicos realizados a los sujetos. Las dosis utilizadas en este estudio fueron de 20, 30, 50 y 75 mg/kg, con la dosis más alta se presentaron ligeros malestares que no fueron de gravedad. (28)

II.1.2.7.- FORMAS DE ADMINISTRACION.

En el hombre generalmente se ha administrado el fármaco puro en cápsulas de 250 y 500 mg o bien tabletas ranuradas de 600 mg.

Los resultados obtenidos al administrar las tabletas o una solución inyectable (vía intramuscular y subcutánea) en perros infectados con *Equinococcus granulosus*, demostraron que ambas formas farmacéuticas son efectivas. (15) (19) (47)

Marshal y col. (32), propusieron que una forma de liberación sostenida, provee protección prolongada contra posibles reinfecciones, lo cual puede ser una alternativa para el control de *Equinococcus* y otras enfermedades parasitarias de importancia médica y veterinaria.

II.1.3.- METODOS DE VALORACION EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.

Se han reportado muy pocos métodos analíticos para la determinación de Prazicuantel en fluidos biológicos, como plasma, leche materna y orina. La mayoría de ellos a pesar de ser sensibles, son muy laboriosos, requieren de mucho tiempo para realizar el análisis y son costosos. A continuación se describen los métodos reportados en la literatura.

II.1.3.1.- METODO FLUOROMETRICO.

El método fluorométrico reportado por Putter en 1979, ha sido utilizado para la determinación de Prazicuantel en plasma (36) (38) (39), orina (17) y leche materna (39). El método requiere de un volumen de 5 ml de fluido biológico, al cual se le agrega KOH 0.1 N para obtener un pH de 13, se extrae el Prazicuantel con 12 ml de una mezcla de benceno-n-hexano (1:4) agitando por 10 minutos, se centrifuga, se separa la fase orgánica y se evapora a un volumen de 5 ml. Se agregan 0.5 ml de KOH 0.03 N y 0.5 ml de HCl 0.03 N, la fase orgánica se transfiere a otro tubo, se agregan 1.5 ml de KOH 0.1 N y se calienta a 80°C por 2 horas. El hidrolizado se lava con 5 ml de ciclohexano (en el caso de orina es necesario un lavado previo con 5 ml de metil-isobutil-cetona).

A 1 ml del hidrolizado se le adicionan 0.45 ml de una mezcla de H_3PO_4 0.1 M y H_3BO_3 0.1M (1:1), y 0.5 ml de una solución de cloruro de dansilo en acetona 1.25 mmol/lit, se calienta por 1 hr. a 40°C y se ajusta el pH a 13 con KOH 1.0 N. El exceso de cloruro de dansilo se hidroliza dejando reposar la solución por 20 min. a

temperatura ambiente. Se lava con ciclohexano, se agregan 0.3 ml de H_3PO_4 1.0 M y se realiza una última extracción con 3 ml de una mezcla de ciclohexano-eter butílico (9:1), la cual se lava con H_3PO_4 0.1 M.

La medición fluorométrica se lleva a cabo una hora después de haber realizado la extracción a una longitud de onda de excitación de 346 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm.

Este método, a pesar de ser muy sensible, ya que tiene un límite de detección de 3 ng/ml para plasma y de 4 ng/ml para leche, es muy laborioso y complicado.

II.1.3.2. -CROMATOGRAFIA DE GASES.

El método fue desarrollado por Diekman (12), y puede ser utilizado para la determinación de Prazicuantel en plasma y en orina.

A 0.5 ml del fluido biológico se le añaden 2 ml de NaOH 0.1 N y 50 μ l de una solución conteniendo 0.5 μ g de estandar interno (2-cicloheptil-carbonil-4-ona-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino-(2,1-a)-isoquinolina). Se extrae con una mezcla de acetato de metilo-eter diisopropílico (30:70), se agita por 10 minutos, la fase orgánica se separa y se lava con 3 ml de una solución amortiguadora de fosfatos a pH 6. Después de secar la solución sobre una mezcla de sulfato de sodio-carbonato de sodio, se evapora a sequedad y se reconstituye con 20 μ l de acetato de metilo.

Las condiciones utilizadas en el análisis fueron:
Columna: vidrio 90 cm, 2 mm de diámetro interno.
Fase estacionaria: OV-3 al 1.5% sobre Volaspher tipo A-2 malla 100-120.
Temperatura del inyector: 290°C. Temperatura del horno: 270°C.
Temperatura del detector: 300°C. (flama alcalina).
Gas acarreador: Helio a 30 ml/min.

El límite de detección es de 10 ng/ml y el coeficiente de variación para una concentración de 0.1 µg/ml es de 4.5%.

II.1.3.3. - METODO RADIOMETRICO.

Para la determinación radioactiva del Prazicuantel en organos (12) (46) y fluidos biológicos (45), se ha utilizado la molecula del farmaco marcado con C¹⁴. El método es muy sensible, pero no es específico, ya que no diferencia el Prazicuantel inalterado de sus metabolitos.

II.1.3.4. - CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION.

Shua-Xua y col. (53), desarrollaron un método por cromatografía de líquidos de alta resolución para determinar Prazicuantel en suero. El método a seguir es el siguiente: A 1 ml de suero se le agregan 10 µl de una solución conteniendo 0.8 µg de estandar interno (2-cicloheptil-carbonil-4-ona-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino(2,1-a)isoquinolina). se mezcla vigorosamente por 30 segundos y se extrae con tres porciones de 2 ml de agua saturada con acetato de etilo, se mezcla por 1 minuto y se centrifuga a 1600 g durante 5 minutos. Las tres porciones de acetato de etilo se combinan y se evaporan a sequedad. La muestra

se reconstituye con 250 μ l de una mezcla de acetonitrilo-agua (38:62), y se inyecta una alícuota de 25 μ l en el cromatografo.

Las condiciones utilizadas en el análisis fueron:

Columna: 10 cm, 4.6 mm de diametro interno de gel de silica octadecil RP-18, 5 micras.

Fase móvil: Acetonitrilo-agua (38:62).

Velocidad de flujo: 1.5 ml/min.

Velocidad de carta: 10 mm/min.

Detector: UV de longitud de onda variable a 210 nm.

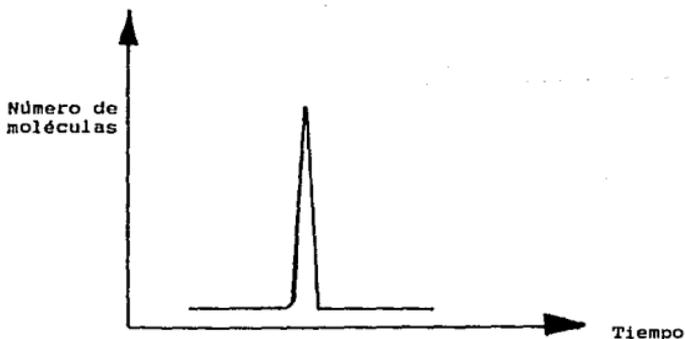
Bajo las condiciones propuestas, el metodo tiene un límite de detección en suero de 2.5 ng/ml y un coeficiente de variación de 2.6% para esta concentración.

Mandour y col., (31) desarrollaron un método para cuantificar Prazicuantel en suero o plasma por CLAR, el cual requiere 0.5 ml de muestra y diazepam como estandar interno., La muestra se extrae con 5 ml de una mezcla de eter/diclorometano (2:1), la cual se evapora a sequedad para su posterior reconstitución con 120 μ l del eluyente cromatográfico y su inyección al cromatografo, utilizando una columna Spherisorb 5 ODS 2.15 x 0.46 cm., un detector U.V. a 210 nm y como fase móvil ACN/H₂O/Metanol (45/45/10).

Se obtienen tiempos de retención para el Prazicuantel y el diazepam de 3.1 y 3.9 min respectivamente. La sensibilidad es de 3 ng/ml de plasma o suero. El rango lineal para plasma es de 0.3-2 μ g/ml. Los coeficientes de variación es de 7.6% a una concentración de 300 ng/ml.

II.2.- CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (CLAR).

La cromatografía es una técnica analítica, la cual permite separar, identificar y cuantificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La muestra es distribuida entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, de tal forma que cada uno de los componentes de la mezcla es selectivamente retenido por la fase estacionaria, debido a fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno y polaridad. La distribución molecular del soluto frente al tiempo corresponde a una gaussiana. No todas las moléculas eluyen de manera exacta en el mismo tiempo. Primero lo hacen unas pocas, hasta eluir un máximo, disminuyendo después el número de moléculas que eluyen. Por lo tanto no todas pasan al mismo tiempo por el detector.



Con esta técnica es usual obtener separaciones en el término de minutos e inclusive en algunos casos, en segundos; con alta resolución, buena sensibilidad (10 ng o hasta 10 picogramos), y su

precisión en caso de análisis cuantitativos suele ser mayor al 1%. La mas importante de sus ventajas es la diversidad de sus aplicaciones tanto a compuestos orgánicos, inorgánicos, muestras de peso molecular muy bajo o muy alto, sustancias liquidas o sólidas, iónicas o covalentes. Además de que permite separar mezclas muy complejas, tal es el caso de aquellas que se encuentran en fluidos biológicos como plasma y orina. (34)

Sus limitaciones incluyen al instrumental, el cual es costoso, y a la necesidad de que el personal que utiliza este método tenga experiencia para obtener el mayor provecho. No es un buen método de identificación ya que los tiempos de retención no son exclusivos, no existe aun un detector universal, y sensible para CLAR. En la figura 2 se esquematiza el instrumental de CLAR.

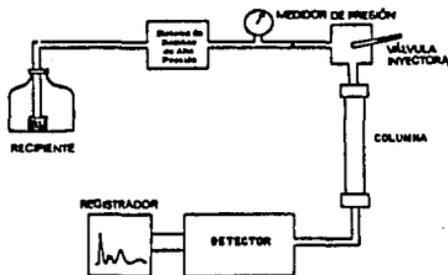


FIGURA 2. Instrumental de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

II.2.1.- FASE MOVIL.

Las características que debe de presentar son las siguientes:

- Disolver la muestra para que esta pueda ser transportada a través de la columna. Puede ocurrir precipitación de la muestra dentro de la cámara de inyección o en la columna si el disolvente de la muestra y la fase móvil son muy diferentes en polaridad.

- No degradar o disolver la fase estacionaria.

- Tener baja viscosidad, ya que es importante en la eficiencia de la separación porque influye en el efecto de transferencia de masa entre la fase móvil y la estacionaria.

- Ser compatible con el tipo de detector utilizado, puesto que el cambio en la composición en la fase móvil puede afectar el funcionamiento del detector.

- Tener la polaridad adecuada para permitir una retención conveniente de la muestra en la columna.

- Debe ser de alta pureza (grado espectroscópico o cromatográfico), para análisis de alta sensibilidad con detectores como el de luz ultravioleta o el de fluorescencia.

Los disolventes mas comunmente empleados en cromatografía líquida de alta resolución son: hexano, cloruro de metileno, cloroformo, tetrahidrofurano, acetonitrilo, isopropanol, metanol, agua. (34)

Recipientes de almacenamiento de la fase móvil.- Pueden utilizarse recipientes de vidrio, acero inoxidable o plásticos inertes. (34)

Se recomienda filtrar las fases móviles y eliminar el oxígeno disuelto en ellas para no obstruir y dañar el sistema de bombeo y la columna. (34)

II.2.2. - SISTEMAS DE BOMBEO.

Las columnas cromatográficas están rellenas de materiales especiales de partículas muy pequeñas, lo cual hace que la resistencia al flujo de la fase móvil sea muy elevada. Por esta razón, se requiere un sistema de bombeo que haga fluir la fase móvil a un flujo razonable, pues de lo contrario los análisis serían excesivamente lentos.

Los aspectos más importantes de todo sistema de bombeo son:

- Presión máxima de operación (usualmente hasta 400 atm).
- Intervalo de volúmenes obtenibles (entre 0.5 y 10 ml/min).
- Reproducibilidad y constancia del flujo (aprox. 1%).
- Características del flujo (continuo o pulsado).

También son importantes la resistencia a líquidos corrosivos, la facilidad para efectuar el cambio de fases móviles y la limpieza del sistema. (34)

II.2.3. - VALVULAS INYECTORAS.

La muestra se introduce en la válvula mediante una jeringa, desplaza el líquido y llena el espacio interno de una pequeña porción del tubo capilar de acero. La muestra se inyecta en la columna accionando la válvula de forma tal que la disposición de

entrada y salida se invierte. De esta forma se logra inyectar a cualquier presión un intervalo muy amplio de tamaños de muestra con un alto grado de reproducibilidad.

Las válvulas inyectoras se fabrican sólo de materiales inertes, como el teflón y el acero inoxidable, y su diseño es tal que resisten presiones muy elevadas. (34)

II.2.4.- PROGRAMADORES DE FASE MOVIL.

Consisten en cambiar la composición de la fase móvil conforme transcurre el análisis. Las ventajas que ofrece esta técnica son: Análisis más rápidos; mejores separaciones; mayor simetría en los picos, y mejor detectabilidad. Sus desventajas son: Necesidad de regenerar la columna e incompatibilidad con el detector en ciertos casos. (34)

II.2.5.- REGISTRADORES.

Su función es representar en un registro gráfico la señal enviada por el detector. Generalmente se utilizan registradores potenciométricos de 1 o 10 mV. (34)

II.2.6.- CONTROLES DE TEMPERATURA.

En muchos casos el control de temperatura que requiere la columna puede permitir una variación de $\pm 2^{\circ}\text{C}$; para trabajar a temperaturas superiores a la del ambiente, se utilizan baños de agua o de otro líquido, con regulación de temperatura, o bien hornos de tipo eléctrico.

El control de temperatura del detector depende del tipo empleado, ya que mientras algunos no lo requieren, otros necesitan un control sumamente minucioso. (34)

II.2.7. - RECOLECTORES DE FRACCIONES.

Para que se puedan recolectar los componentes de la muestra analizada, se requieren columnas especiales, capaces de trabajar con muestras grandes, y detectores que no degraden o destruyan los componentes ya separados. Hay recolectores automáticos y manuales, bien como accesorios o como componentes del instrumento. (34)

II.2.8. - MEDICION DE FLUJOS.

Los métodos gravimétrico y volumétrico, consisten respectivamente en pesar o medir el volumen de la fase móvil recolectada durante un cierto lapso de tiempo.

Otros consisten en un pequeño tubo de vidrio de sección cónica, en cuyo interior, una pequeña esfera metálica flota dentro del líquido por efecto de la fricción que produce el paso de éste dentro de dicho tubo. La altura a la que se mantiene la esfera indica el flujo obtenido. No es exacto y requiere de calibración.

El medidor de burbuja, consta de un tubo de vidrio de volumen conocido a través del cual fluye la fase móvil. La forma como se mide el flujo es introduciendo una burbuja y midiendo el tiempo de su recorrido a través del tubo. Este método es muy rápido, exacto y preciso, y no requiere calibración.

En la actualidad se puede decir que no hay necesidad de medir los flujos de la fase móvil; sobre todo en el caso de sistema de bombeo de volumen constante controlados por medio de microprocesadores electrónicos, los cuales reciben las ordenes del operador y automáticamente ajustan las condiciones de operación de la bomba para dar el flujo requerido en la orden. (34)

II.2.9. - COLUMNAS Y FASES ESTACIONARIAS.

II.2.9.1. ~ CARACTERISTICAS GENERALES:

Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. El acero inoxidable es el mas usado (turbore stainless steel). Se ha empleado vidrio de paredes gruesas, pero tiene el inconveniente de no permitir conexiones metal-vidrio herméticas a altas presiones. (34)

La longitud de la columna es por lo general de 10 a 50 cm. En la mayoría de los casos el diámetro es de alrededor de 3 a 4 mm.

La capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno. En general las columnas muy eficaces son de diámetro pequeño (3 mm) y efectúan análisis muy rápidos; su capacidad en cambio es muy limitada y la muestra debe ser entonces de tamaño muy reducido, por lo que exige un detector muy sensible.

Se prefieren la columnas rectas, sobre todo porque hay cierta pérdida de eficiencia cuando se doblan las columnas. Pese a esto, se pueden utilizar columnas rectas conectadas herméticamente entre si, o bien columnas enrolladas o de forma en "U", "L", "S" u "8", estas últimas facilitan el control de la temperatura. (34)

En la actualidad se puede decir que no hay necesidad de medir los flujos de la fase móvil; sobre todo en el caso de sistema de bombeo de volumen constante controlados por medio de microprocesadores electrónicos, los cuales reciben las ordenes del operador y automáticamente ajustan las condiciones de operación de la bomba para dar el flujo requerido en la orden. (34)

II.2.9.- COLUMNAS Y FASES ESTACIONARIAS.

II.2.9.1.- CARACTERISTICAS GENERALES:

Básicamente la columna consiste en un segmento de tubo de algún material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones. El acero inoxidable es el mas usado (turbore stainless steel). Se ha empleado vidrio de paredes gruesas, pero tiene el inconveniente de no permitir conexiones metal-vidrio herméticas a altas presiones. (34)

La longitud de la columna es por lo general de 10 a 50 cm. En la mayoría de los casos el diámetro es de alrededor de 3 a 4 mm.

La capacidad de la columna depende de su longitud, diámetro y material de relleno. En general las columnas muy eficaces son de diámetro pequeño (3 mm) y efectúan análisis muy rápidos; su capacidad en cambio es muy limitada y la muestra debe ser entonces de tamaño muy reducido, por lo que exige un detector muy sensible.

Se prefieren la columnas rectas, sobre todo porque hay cierta pérdida de eficiencia cuando se doblan las columnas. Pese a esto, se pueden utilizar columnas rectas conectadas herméticamente entre si, o bien columnas enrolladas o de forma en "U", "L", "S" u "B", estas últimas facilitan el control de la temperatura. (34)

II.2.9.2. - FASES ESTACIONARIAS.

La fase estacionaria debe ser estable y resistente a altas presiones. Los tipos de soporte de fase estacionaria que se pueden encontrar en las columnas de CLAR son: no porosos, totalmente porosos y porosos. (34)

El tamaño de partícula es importante porque controla el proceso de difusión de las moléculas de la muestra hacia adentro y hacia afuera de los poros de la partícula. A medida que el tamaño de la partícula aumenta, el proceso de difusión se hace más lento, es decir, la transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria es lenta. Si se aumenta el flujo de la fase móvil para obtener análisis rápidos, el proceso de difusión, que es lento, hace que la columna pierda eficacia y, por lo tanto, resolución. Conforme disminuye el tamaño de partícula, la profundidad de los poros también disminuye y el proceso de transferencia de masa se hace más rápido, permitiendo análisis rápidos sin pérdidas en la resolución (tamaño menor a 50 μm). (34)

Los llamados adsorbentes pelliculares, también conocidos con el nombre de "adsorbentes de capa porosa", consisten en partículas esféricas, generalmente vitreas, no porosas, recubiertas de una capa muy fina de un adsorbente poroso, como gel de sílice o alumina (alrededor de 1 μm). (34)

II.2.10. -DETECTORES.

En términos de su aplicación a un cierto problema, o a evaluar las cualidades de un cierto diseño, deben tenerse en cuenta ciertas propiedades generales como las siguientes:

RESPUESTA. Puede ser universal o selectiva.

SENSIBILIDAD. Razón entre la señal generada y la cantidad de muestra que produce dicha señal.

RUIDO. Es la variación de la señal en el instrumento que puede ser producida por fallas electrónicas, variaciones de flujo o temperatura, fluctuaciones en el voltaje, burbujas de aire atrapadas en el detector, etc.

LINEARIDAD. Razón entre las concentraciones máximas y mínimas respecto a las cuales la respuesta del detector es lineal.

ESTABILIDAD. Debe ser insensible a los cambios de temperatura y a la variación de flujo a la vez que ser compatible con programaciones de fase móvil. (34)

II.2.11.1. - DETECTOR DE INDICE DE REFRACCION.

Mide la diferencia entre los índices de refracción del disolvente puro y de la solución de la muestra que sale de la columna; de esta manera se detecta cualquier cambio en la composición de la fase móvil. La respuesta de este detector es universal y su sensibilidad es moderada, por lo general del orden de microgramos o partes por millón. Para poder observar diferencias en el índice de refracción del orden de 1×10^{-7} unidades se requiere un control de temperatura de $\pm 0.0001^{\circ}\text{C}$.

Los detectores de índice de refracción no son instrumentos

muy estables ni de fácil manejo, Estas pequeñas dificultades han limitado su uso. (34)

II.2.11.2. - DETECTOR DE LUZ ULTRAVIOLETA.

Su funcionamiento se basa en la absorción de la luz por parte de la muestra al pasar a través de ella un haz de luz monocromática ultravioleta. Es lógico suponer que la respuesta de este detector es selectiva, ya que solo se detectan los compuestos que absorben luz de la longitud de onda a la que opera el detector.

Los detectores de longitud de onda variable presentan algunas ventajas sobre los fotómetros, y entre las mas sobresalientes cabe mencionar:

- Es posible seleccionar la longitud de onda óptima para la muestra.

- Pueden evitarse algunos problemas de la fase móvil (absorción excesiva).

- Algunos diseños permiten obtener el espectro de absorción de cada compuesto por separado.

Es lícito considerar a los detectores de luz ultravioleta como los de uso mas generalizado en cromatografía líquida, en especial en el campo de las investigaciones bioquímicas, porque muchos compuestos de interes biológico absorben intensamente en la región ultravioleta. La muestra no resulta alterada por el proceso de detección y el intervalo lineal es de aproximadamente 3000; este detector no es sensible a los cambios de flujo o de temperatura y es apto para programaciones de fase móvil. (34)

II.2.11.3.- DETECTOR DE FLUORESCENCIA.

Es posible detectar con este instrumento cantidades del orden de (10^{-12} g). Su manejo requiere cierto cuidado y su mayor ventaja es su alta selectividad de respuesta y su sensibilidad. Cuando la muestra no tiene propiedades fluorescentes, es posible formar compuestos derivados de la muestra original que si posee dichas propiedades. (34)

II.2.11.4.- DETECTOR ELECTROQUIMICO.

Está basado en el hecho de que la corriente es medida como función del tiempo con la aplicación constante de potencial a un electrodo fijo expuesto a un fluido en movimiento. En las formas mas comunes de detectores electroquímicos, el fármaco es convertido a su forma oxidada, produciendo uno o mas electrones por molécula que reacciona. Este compuesto inestable reacciona a una forma estable y sale de la celda. La corriente instantanea es proporcional a la concentración del fármaco en la celda. Debe de señalarse que no todas las moléculas son oxidadas y una eficiencia de conversión del 10% es aceptable. (8)

II.2.11.5.- DETECTOR DE DIODOS.

Tiene la ventaja sobre los demás de que da información de picos que se translapan y de interferencias secundarias. (8)

II.3.- IMPORTANCIA DE METODOS ANALITICOS EN ESTUDIOS DE FARMACOCINETICA Y METABOLISMO.

Para estudios de farmacocinética y metabolismo, es requisito tener datos confiables disponibles. Los estudios de disposición de fármacos en los organismos vivos son un tema para la farmacología y la bioquímica, pero su problema principal es su análisis químico: separación, identificación y ensayo cuantitativo. Cuando un fármaco ha sido introducido en el organismo vivo, puede ser transportado a través de la circulación, enlazado reversible o irreversiblemente a varios tejidos, transformado y excretado, por lo que es necesario contar con métodos sensibles para poder cuantificarlos en los fluidos biológicos. (21)

Actualmente la CLAR es la técnica mas extensamente utilizada, ya que se pueden obtener separaciones rápidas y detecciones hasta de subnanogramos. Es muy utilizada para separar metabolitos conjugados, además de que puede ser automatizada facilmente. Sin embargo algunos fármacos son analizados por cromatografía de gases cuando no se obtiene la sensibilidad requerida por CLAR. También se utilizan las técnicas de inmunoanálisis y espectrofotometría de masas. (21)

Los modelos farmacocinéticos dependen en gran parte de la sensibilidad del método analítico empleado para determinar las concentraciones de fármaco en plasma. La detección y caracterización de un compartimento puede ser errónea por la escasez de sensibilidad en el ensayo, cuando la concentración del fármaco está a un nivel de concentración por debajo del límite de sensibilidad. (21)

A cualquier nivel de sensibilidad, un método analítico debe ser preciso y exacto. La precisión puede ser determinada fácilmente con un análisis estadístico de las repeticiones del ensayo. La exactitud requiere de una validación con muestras de concentraciones conocidas a través de la duración del análisis de las muestras. La precisión y exactitud están directamente relacionadas con la concentración que va a ser medida, mientras menor sea la concentración, mayor será el error del ensayo.

Otro parámetro importante es la velocidad del análisis, ya que para estudios farmacocinéticos se requieren de un gran número de datos, por lo que se requiere que el método sea rápido. (21)

II.3.1.- TRATAMIENTO DE MUESTRAS.

La CLAR demanda soluciones claras libres de partículas. Miscibilidad del solvente con la fase móvil. Compatibilidad del solvente con la fase estacionaria.

Para lo cual se pueden seguir las siguientes estrategias:

- i) remover las interferencias y los compuestos irrelevantes, o
- ii) remover los analitos de la muestra, en donde se puede realizar una preconcentración.

Los métodos de separación y limpieza más frecuentemente utilizados son filtración, precipitación, ultrafiltración, sedimentación (centrifugación), evaporación, diálisis, extracción de sólidos y líquidos con líquidos, extracción de sólidos por adsorción en sólidos y cromatografía. (27) (48)

Las muestras biológicas, en particular los homogenados de tejidos y el plasma contienen una considerable cantidad de proteínas; los métodos mas frecuentemente empleados son la

precipitación, ultrafiltración y diálisis. La aplicación de solventes como metanol o acetonitrilo son utilizados en CLAR ya que son compatibles cuando se utiliza fase reversa, a pesar de que no se eliminan totalmente las proteínas. (48)

EXTRACCION EN FASE SOLIDA.- Se han utilizado materiales para fase reversa e intercambio iónico de CLAR, así como microcolumnas, y la clásica sílica, como Extrelut^R (E. Merk), o bien sílica y fase reversa como cartuchos Sep-pak^R (Millipore-Waters) (27), en los cuales el fluido biológico es forzado a pasar a través de una columna rellena de partículas sólidas, la cual debe ser preacondicionada antes. Los analitos muestran una gran afinidad por la superficie del sólido en presencia del fluido de la muestra y por lo tanto son adsorbidos en el empaque de la columna. La columna es lavada con un solvente lo suficientemente polar para eluir los compuestos irrelevantes, pero no los analitos. Posteriormente los analitos son eluidos con un solvente adecuado, para su posterior análisis. Los compuestos de muestras biológicas poseen diferentes polaridades por lo que los compuestos más polares son eliminados lavando con agua y los compuestos lipofílicos se retienen en el empaque. (48)

La superficie de la fase sólida puede ser significativamente modificada por la fuerte adsorción de los componentes de la matriz, el plasma contiene aproximadamente un 70% de proteínas que muestran una fuerte adsorción en empaques no polares en presencia de agua, por lo que el empaque puede ser saturado con las mismas y la adsorción de los analitos ocurre en las proteínas, lo cual es indeseable por lo que se recomienda la disminución de proteínas por algún otro método, para no dañar los cartuchos. (48)

II.3.2. - PROPIEDADES PARTICULARES DEL PLASMA.

La característica principal del plasma es la presencia de gran cantidad de proteínas (globulinas, albumina, fibrinógeno), que aunque química y físicamente son diferentes a las moléculas pequeñas de los fármacos que generalmente se cuantifican, hay siempre una gran afinidad entre los fármacos y las proteínas y solo por ultrafiltración o diálisis se pueden remover las proteínas del fármaco, o alternativamente se puede medir el fármaco libre perdiendo el total de la misma. Por lo que el primer paso para analizar una muestra plasmática, es la obtención de una solución acuosa libre de proteínas. (8)

A pesar de que el plasma es un fluido complejo, su composición es estable y aún en pacientes, en pocos casos se presentan cambios en su composición que puedan preocupar al analista. El pH del plasma nunca se encuentra fuera del rango de 7.30 a 7.50 y el total de proteínas y sales también está controlada. El contenido de lípidos puede variar considerablemente de acuerdo con el tiempo y la naturaleza de los alimentos, lo cual puede ser un factor que afecte al análisis y por lo tanto se puede requerir de un paso extra para remover los lípidos.

Algunos cambios en los constituyentes del plasma pueden tener un impacto en los niveles del fármaco que junto con otros factores pueden interferir en el análisis.

Otro factor a tomar en cuenta dentro de los constituyentes del plasma es la presencia de enzimas que puedan degradar el fármaco que se desea analizar. (8)

II.3.3. - PROPIEDADES PARTICULARES DE LA ORINA.

La orina en contraste con el plasma, está libre de proteínas y lípidos, sin embargo hay una mayor variación en la composición de la orina y esto se puede observar en el color ambar oscuro de la orina colectada en la mañana y en el color pálido de la orina colectada durante el día. La composición de la orina depende en gran parte de la dieta.

Uno de los problemas mas importantes es la gran diferencia de volúmenes que se pueden obtener. En la excreción urinaria, lo que interesa es la cantidad excretada y no la concentración; si el volumen es muy grande, la concentración del fármaco será muy pequeña y por lo tanto el análisis estará sujeto a errores asociados con bajas concentraciones. (8)

La orina está sujeta a cambios de pH en un amplio rango, que dependen en su mayor parte de la dieta y de los medicamentos. El rango normal de pH de la orina se encuentra entre 5.5 y 7.0. La excreción del fármaco depende en gran medida del pH y por lo tanto los fármacos básicos se excretan mas eficientemente en orina ácida, mientras que los fármacos ácidos se excretan mejor en orina alcalina. La orina que se almacena va perdiendo el CO₂ y por lo tanto se vuelve mas alcalina, provocando la precipitación de fosfatos inorgánicos. La composición de la orina fresca es diferente a la composición de la orina almacenada, por lo que el método se debe evaluar tanto con la orina fresca como con la orina almacenada, para elucidar la estabilidad del fármaco en las muestras almacenadas. (8)

CAPITULO III
PARTE EXPERIMENTAL

III.1.- DETERMINACION DE PRAZICUANTEL EN PLASMA Y EN ORINA.

III.1.1.- MATERIAL Y EQUIPO.

- Balanza Sartorius, modelo 1800.
- Balanza granataria Ohaus, Galaxy TM 4000 D.
- Centrifuga Beckman, modelo 18700.
- Micropipeta Eppendorff de 100 a 1000 mcl.
- Micropipeta Finnppipette de 50 a 250 mcl.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Beckman, equipado con dos bombas, modelo 110 B.
- Integrador Beckman, modelo 427.
- Detector U.V. Beckman, modelo 164 de longitud de onda variable.
- Ultrasonido Branson PC 820.
- Bomba de vacío Felisa, modelo 1410.
- Parrillas Sybron thermoline, modelos 1000 y 1900.
- Cartuchos Sep-pak, Waters Assoc.

III.1.2.- REACTIVOS.

- Prazicuantel químicamente puro obtenido de Bayer México.
- Estandar interno: 2-cicloheptil-carbonil-4-oxo-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4-H-pirazino-(2,1a)-isoquinoleína, donado por Merck, Alemania.
- Hidróxido de sodio lentejas, R.A., J.T. Baker.
- Fosfato de sodio monobásico, R.A., J.T. Baker.
- Fosfato de sodio dibásico, R.A., J.T. Baker.

- Sulfato de sodio anhidro, R.A., J.T. Baker.
- Acetona, R.A., J.T. Baker.
- Acetato de etilo, R.A., J.T. Baker.
- Eter isopropilico, R.A., J.T. Baker.
- Metanol, R.A., J.T. Baker.
- Acetonitrilo, grado HPLC, J.T. Baker.
- Agua desionizada, grado HPLC:
- Nitrógeno AGA.

III.1.3. - SOLUCIONES.

- Hidróxido de sodio 0.2N.
- Solución amortiguadora de fosfatos 0.05M pH= 5.0.
- Mezcla de acetato de etilo/eter isopropilico (70:30 v/v).
- Solución estandar de prazicuantel en acetona de concentración 1.0 mg/ml.
- Solución estandar de prazicuantel en plasma de concentración de 100 mcg/ml.
- Solución estandar de prazicuantel en orina de concentración de 1.0 mg/ml.
- Solución de estandar interno en fase móvil ACN/H₂O 45:55 a una concentración de 100 mcg/ml.

III.1.4. - PREPARACION DE LAS SOLUCIONES.

- Solución Estandar de Prazicuantel. - Pesar exactamente 10 mg del fármaco y aforar a un volumen de 10 ml con acetona (1.0

mg/ml). De la solución anterior hacer las diluciones necesarias con acetona para obtener concentraciones de 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.250 y 0.125 mcg/ml.

- Soluciones de Prazicuantel en Plasma.- Pesar exactamente 10 mg del fármaco, disolver y aforar con acetona a un volumen de 10 ml. Tomar 1.0 ml y aforar con plasma a 10 ml. A partir de esta solución se hacen las diluciones correspondientes para obtener las concentraciones de 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.250 y 0.125 mcg/ml, aforando con plasma.

- Soluciones de Prazicuantel en Orina.- Pesar exactamente 10 mg del fármaco, disolver en 0.5 ml de acetona y aforar con orina filtrada a un volumen de 10 ml (1.0 mg/ml). Tomar una alícuota de 1.0 ml de esta solución y aforar a 10 ml con agua desionizada, utilizar esta solución para obtener las concentraciones de 4.0, 2.0, 1.0, 0.5, 0.250 y 0.125 mcg/ml, diluir y aforar con agua desionizada.

- Solución Patrón de Estandar Interno.- Pesar exactamente 1 mg del fármaco, disolver y aforar a 10 ml con fase móvil ACN/H₂O 45:55 (100 mcg/ml). Tomar 1 ml de esta solución y aforar con fase móvil a 10 ml, para obtener una concentración de 10 µg/ml.

III.2.- DESARROLLO DEL METODO.

III.2.1.- METODO DE EXTRACCION.

Después de probar diferentes condiciones en el método de extracción, la técnica con la que se obtuvieron mejores resultados

fué la siguiente:

A 2 ml de muestra (plasma u orina) previamente alcalinizada con 1.0 ml de hidróxido de sodio 0.2N, se le adicionan 50 μ l (10 μ g/ml) de estandar interno a las concentraciones de 0.125, 0.250, 0.5 y 1.0 μ g/ml, y 100 μ l a las concentraciones de 2.0 y 4.0 mcg/ml, con el fin de obtener un pico de estandar interno de tamaño adecuado.

Se activa el cartucho sep-pak con 5 ml de metanol R.A. y 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH= 5.0 (0.05 M), se pasa la muestra a través del cartucho y se lava con 20 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH= 5.0 (0.05 M), se eluye la muestra con 6.0 ml (3 ml x 2 veces) de una mezcla de acetato de etilo/eter isopropílico 70:30 v/v. Una vez reunidas las fracciones de la fase orgánica, se procede a secar con sulfato de sodio anhidro y se evapora a sequedad en baño maría bajo corriente de nitrógeno.

El residuo se reconstituye con 100 μ l de fase móvil ACN/H₂O 45:55 y se inyectan 20 μ l en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

El cartucho sep-pak se lava con 22 ml de agua desionizada, 8 ml de metanol R.A. y 20 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH= 5.0 (0.05 M).

El procedimiento se esquematiza en la figura 3.

2.0 ml de muestra.
↓
1.0 ml de NaOH 0.2N.
↓
50 mcl o 100 mcl de estandar interno (c= 10 µg/ml).
↓
Cartucho sep-pak activado* con 5 ml de MeOH + 5 ml de
solución amortiguadora de fosfatos pH= 5.0 (0.05 M).
↓
Añadir la muestra.
↓
Lavar con 20 ml de solución amortiguadora
de fosfatos pH= 5.0 (0.05 M).
↓
Eluir con mezcla de acetato de etilo/eter isopropilico
70:30 v/v, (3 ml x 2 veces).
↓
Secar con sulfato de sodio anhidro.
↓
Evaporar en baño maria bajo corriente de nitrógeno.
↓
Reconstituir con 100 µl de fase móvil ACN/H₂O 45:55.

* Empaque no polar de sílica modificada Cts.

Figura 3.- Diagrama del método analítico utilizado para la cuantificación de Praziquantel en plasma y en orina.

III.2.2. - CONDICIONES CROMATOGRAFICAS.

Las condiciones cromatográficas utilizadas para la cuantificación fueron las siguientes:

Columna: Cis ODS con tamaño de partícula de 5 micras.

Longitud de 25 cm. Diámetro interno 4 mm.

Fase móvil: Acetonitrilo /agua: 45:55 (v/v).

Flujo: 1.5 ml/min.

Sensibilidad del detector: 0.005 AUF.

Longitud de onda: 217 nm

Velocidad de carta: 0.25 cm/min.

III.3. - Validación del Método Analítico.

III.3.1.- Linealidad.

Para determinar si la relación entre concentración y alturas era lineal, se prepararon 3 curvas de calibración en plasma y orina a concentraciones de 0.125, 0.250, 0.5, 1.0, 2.0, y 4.0 $\mu\text{g/ml}$, y se cuantificaron siguiendo el procedimiento descrito en la figura 3. Para cada una de las curvas se determinó el coeficiente de correlación, la pendiente y la ordenada al origen.

III.3.2.- Repetibilidad.

Con el fin de determinar la repetibilidad del método analítico en el mismo día bajo condiciones idénticas de operación, aparato y laboratorio se prepararon 3 curvas de calibración de prazicuantel en plasma y en orina a concentraciones de 0.125,

0.250, 0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 $\mu\text{g/ml}$. La repetibilidad del método en diferentes días se determinó analizando 3 curvas por día en 2 días diferentes, determinándose el coeficiente de correlación, pendiente y ordenada al origen, así como el coeficiente de variación.

III.3.3.- Exactitud del método.

Para determinar la exactitud del método analítico se prepararon 6 curvas de calibración en plasma y 6 en orina en el rango de concentraciones de 0.125 a 4.0 $\mu\text{g/ml}$ y se compararon con sus respectivos estándares.

La exactitud se evaluó mediante el coeficiente de variación y se realizó la gráfica de concentración adicionada vs. concentración recuperada para ambos fluidos biológicos, que indica la exactitud y la linealidad del método.

III.3.4.- Concentración mínima detectable.

Para determinar la concentración mínima diferenciable del ruido de fondo, se prepararon diluciones de Prazicuantel en plasma y en orina en el rango de concentraciones de 7.8 a 125 ng/ml , y se procesaron de acuerdo a los lineamientos descritos en la figura 3.

III.3.5.- Selectividad.

La selectividad se evaluó comparando los cromatogramas obtenidos al analizar plasma blanco (sin fármaco) y orina blanco (0.5 ml de orina filtrada sin fármaco aforados a 50 ml con agua desionizada), contra plasma y orina sembrados con prazicuantel.

III.3.6.- Tolerancia del método analítico.

La tolerancia del método se determinó analizando por duplicado muestras de concentración de 1.0 $\mu\text{g/ml}$, las cuales se inyectaron utilizando la fase móvil con diferentes proporciones (ACN/ H_2O : 50:50, 55:45, 60:40 y 40:60).

Así mismo se efectuaron inyecciones en diferentes columnas para ver que tan tolerable era el método en cuanto al cambio de columnas.

III.3.7.- Estabilidad.

Para verificar la estabilidad del Prazicuantel en plasma, se mantuvieron en refrigeración y en congelación muestras por duplicado a concentraciones de 0.125 y 4.0 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras de orina se prepararon a una concentración de 1.0 mg/ml , las cuales se conservaron también en refrigeración y en congelación para posteriormente hacer diluciones a concentraciones de 0.125 y 4.0 $\mu\text{g/ml}$. Las muestras se analizaron cada semana, durante 1 mes y se cuantificó la pérdida de fármaco.

CAPITULO IV RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados del método analítico desarrollado siguiendo los lineamientos descritos en la sección anterior.

Debido a que los parámetros de validación ya han sido reportados anteriormente para el sistema, solo se presentan los resultados del método.

IV.1.- DETERMINACION DE PRAZICUANTEL EN PLASMA Y EN ORINA POR CLAR.

Utilizando el método desarrollado (sección III.2.1) y bajo las condiciones cromatográficas señaladas en la sección 2.2, se encontró un tiempo de retención de 6.0 minutos para el Prazicuantel y de 8.0 minutos para el estandar interno.

En la figura 4 se presentan los cromatogramas típicos obtenidos al analizar muestras de plasma y de orina.

IV.2.- PARAMETROS VALIDADOS.

IV.2.1.- LINEARIDAD.

En la tabla I, se presentan los resultados de linealidad del método en plasma de las 3 curvas de calibración preparadas utilizando estandar interno, y en la figura 5, se muestra la gráfica promedio.

En la tabla II se encuentran los resultados de linealidad obtenidos de 3 curvas de calibración en orina utilizando estandar interno, la gráfica promedio se muestra en la figura 6.

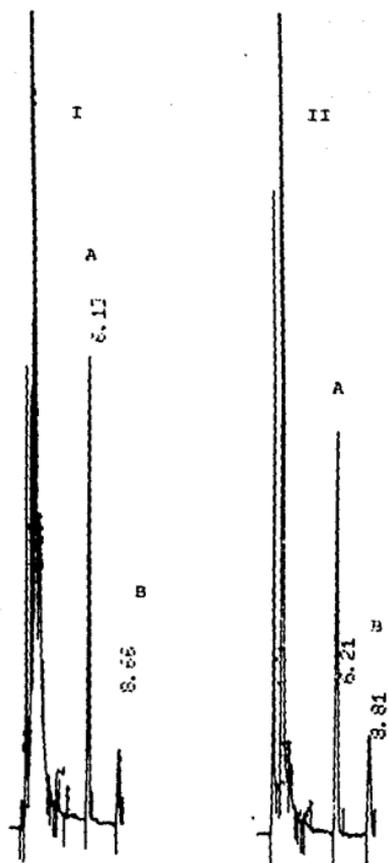


FIGURA 4. Cromatogramas típicos de Plasma (I) y Orina (II), en donde A es el Prazicuantel ($2 \mu\text{g/ml}$) y B es el estándar interno ($0.5 \mu\text{g/ml}$).

TABLA I.

Linealidad y precisión del método analítico para la cuantificación de Prazicuantel en plasma.

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Altura/EI Promedio	Desviación Estandar	C. V. (%)
0.125	0.9176	0.06599	9.37
0.250	1.6796	0.09170	5.46
0.500	3.2282	0.23142	7.18
1.000	6.6138	0.08807	1.30
2.000	12.8737	0.33888	2.63
4.000	26.7430	0.34179	1.28
$a =$	0.655		
$b =$	-0.059		
$r =$	0.9997		
$r^2 =$	0.9995		

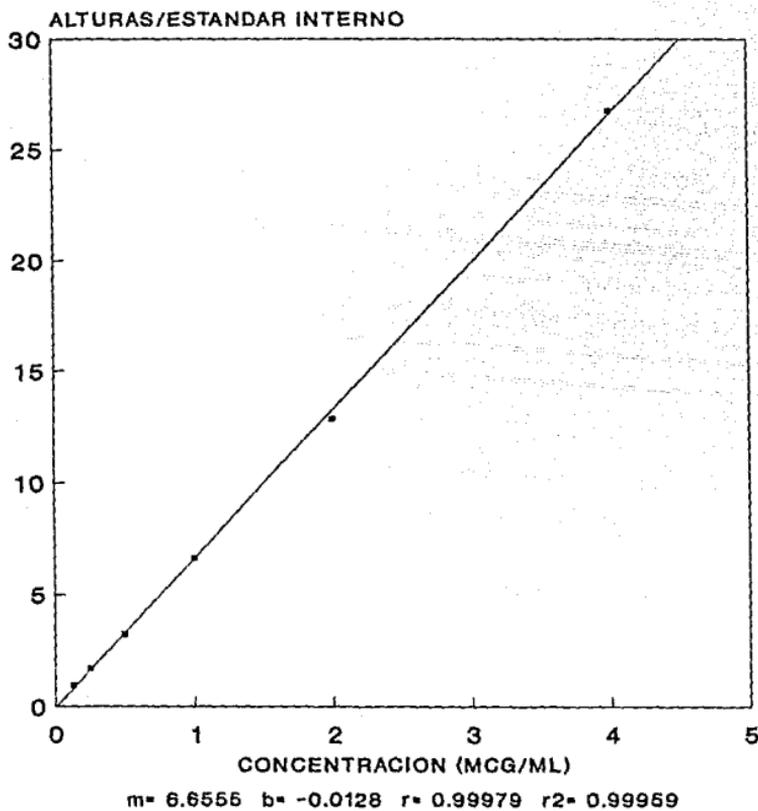


FIGURA 5. Linearidad del método analítico para la cuantificación del Prazicuantel en plasma.

TABLA II.

Linealidad y precisión del método analítico para la cuantificación de Prazicuantel en orina.

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	Altura/EI promedio	Desviación estandar	C. V. (%)
0.125	0.1699	0.01210	7.13
0.250	0.3404	0.03088	9.07
0.500	0.6508	0.02941	4.52
1.000	1.2496	0.05036	4.03
2.000	2.6143	0.15386	5.89
4.000	5.2638	0.19482	3.70
m=	1.31558		
b=	-0.0119		
r=	0.99990		
r ² =	0.99980		

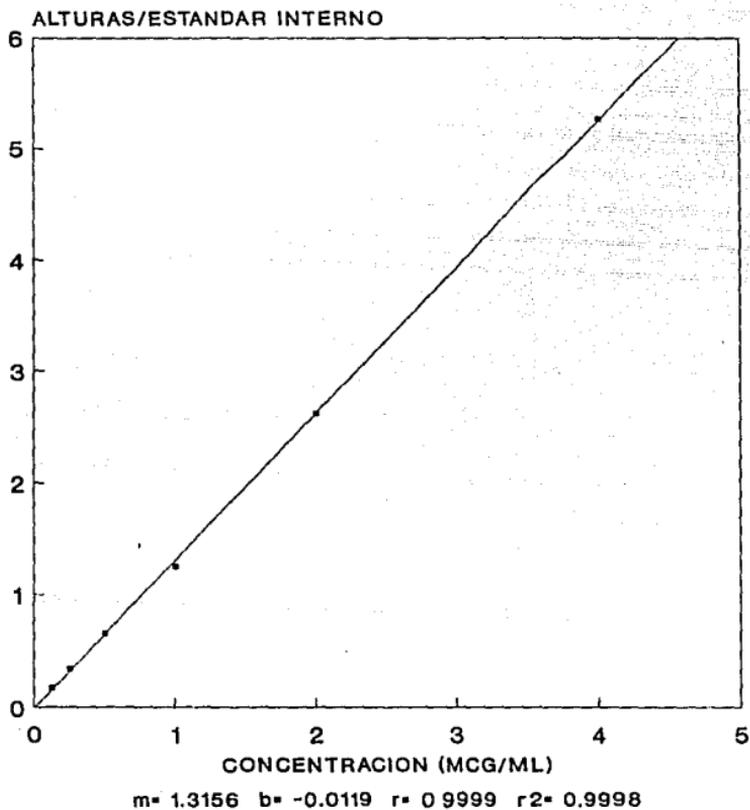


FIGURA 6. Linealidad del método analítico para la cuantificación de Prazicuantel en orina.

IV.2.2. - REPETIBILIDAD.

En las tablas III, IV y V se presentan los valores de los porcentajes de extracción, desviaciones estandar y sus respectivos coeficientes de variación, al evaluar 3 curvas de calibración de Prazicuantel en plasma preparadas el mismo día, y 3 preparadas en diferentes días, así como los resultados de los dos días respectivamente.

En las tablas VI, VII y VIII, se presentan los resultados al evaluar la repetibilidad en el mismo día y en diferentes días al cuantificar el Prazicuantel en orina.

Tabla III. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de Prazicuantel en plasma. 1^{er} Día.

Conc. ($\mu\text{g/ml}$)	% extracción promedio	desviación estandar	C.V (%)
0.125	87.87	7.6164	8.69
0.250	89.22	8.0015	8.97
0.500	84.81	8.2586	9.74
1.000	94.39	5.4585	5.78
2.000	88.10	7.2328	8.40
4.000	90.57	6.6953	7.39
\bar{x}	88.79		
s	3.4374		
C.V. (%)	3.89		

Tabla IV. Repetibilidad del método analítico en plasma para la cuantificación de Prazicuantel. 2^{do} Día.

Conc. (µg/ml)	% extracción promedio	desviación estandar	C. V. (%)
0.125	86.84	6.4067	7.38
0.250	87.67	5.2629	6.00
0.500	80.49	5.0580	6.28
1.000	81.78	1.4684	1.80
2.000	88.82	3.5749	4.03
4.000	91.55	2.6615	2.91
\bar{x} =	86.19		
s=	4.2473		
C. V. (%)	4.93		

Tabla V. Repetibilidad del método analítico en plasma para cuantificar Prazicuantel en diferentes. Días 1 y 2.

Conc. (µg/ml)	% de extracción promedio	desviación estandar	C. V. (%)
0.125	87.25	6.3109	7.23
0.250	88.45	6.1169	6.92
0.500	82.65	6.5868	7.95
1.000	88.09	7.7799	8.83
2.000	87.48	5.3142	6.08
4.000	91.06	4.5885	5.04
\bar{x} =	87.49		
s=	2.7390		
C. V. (%)	3.13		

Tabla VI. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de Prazicuantel en orina. 1^{er} Día.

Conc. (µg/ml)	% extracción promedio	desviación estandar	C. V. (%)
0.125	105.41	6.1743	5.86
0.250	104.70	1.0737	1.03
0.500	98.42	6.5548	6.66
1.000	100.47	0.4194	0.42
2.000	102.21	6.3450	6.21
4.000	104.91	6.4094	6.11
\bar{x} =	75.13		
s=	3.5364		
C. V. (%)	4.71		

Tabla VII. Repetibilidad del método analítico en orina para la cuantificación de Prazicuantel. 2^{do} Día.

Conc. (µg/ml)	% extracción promedio	desviación estandar	C. V. (%)
0.125	92.72	6.5984	7.12
0.250	113.14	10.2749	9.08
0.500	101.54	4.5915	4.52
1.000	99.88	4.0273	4.03
2.000	106.51	6.2703	5.89
4.000	101.50	3.7593	3.70
\bar{x} =	102.55		
s=	6.8368		
C. V. (%)	6.67		

Tabla VIII. Repetibilidad del método analítico en orina para la cuantificación de Prazicuantel en días diferentes. Días 1 y 2.

Concentración (mcg/ml)	% de extracción promedio	desviación estandar	C.V. (%)
0.125	99.06	8.9986	9.08
0.250	108.92	8.0038	7.35
0.500	99.98	5.3428	5.34
1.000	100.18	2.5812	2.58
2.000	104.38	6.1129	5.86
4.000	103.21	5.0552	4.90
\bar{x} =	102.62		
s=	3.7057		
C.V. (%)	3.61		

IV.2.3.- EXACTITUD.

Para determinar si el método analítico es exacto, se determinó el coeficiente de variación total de cada día y en días diferentes (Tablas IX y X) y se realizó la gráfica de concentración adicionada vs. concentración recuperada, para plasma y orina (gráficas en las figuras 7 y 8), en base a los resultados de las tablas XI y XII respectivamente.

Tabla IX. Exactitud del método analítico para la determinación de Prazicuantel en plasma.

	1 ^{er} Día	2 ^{do} Día	Días diferentes
% extrac. promed.	88.79	86.10	87.49
s	6.90868	5.44228	6.1822
C. V.	7.78 %	6.31 %	7.07 %

Tabla X. Exactitud del método analítico para la determinación de Prazicuantel en orina.

	1 ^{er} Día	2 ^{do} Día	Días diferentes
% extrac. promed.	102.89	102.55	102.62
s	5.12667	8.33478	6.72246
C. V.	4.99 %	8.13 %	6.55 %

Tabla XI. Valores de concentración adicionada vs. concentración recuperada, en plasma, en el rango de concentraciones estudiado.

μg adicionados	μg recuperados	% extracción	
0.125	0.109	87.25	$m = 0.911119$ $b = -0.02888$ $r = 0.99979$ $r^2 = 0.99957$
0.250	0.221	88.45	
0.500	0.413	82.65	
1.000	0.881	88.09	
2.000	1.749	87.46	
4.000	3.642	91.06	

Tabla XII. Valores de concentración adicionada vs. concentración recuperada, en orina, en el rango de concentraciones estudiado.

μg adicionados	μg recuperados	% extracción	
0.125	0.124	99.06	$m = 1.03466$ $b = -0.0058$ $r = 0.99992$ $r^2 = 0.99985$
0.250	0.272	108.92	
0.500	0.500	99.98	
1.000	1.002	100.18	
2.000	2.087	104.36	
4.000	4.128	103.21	

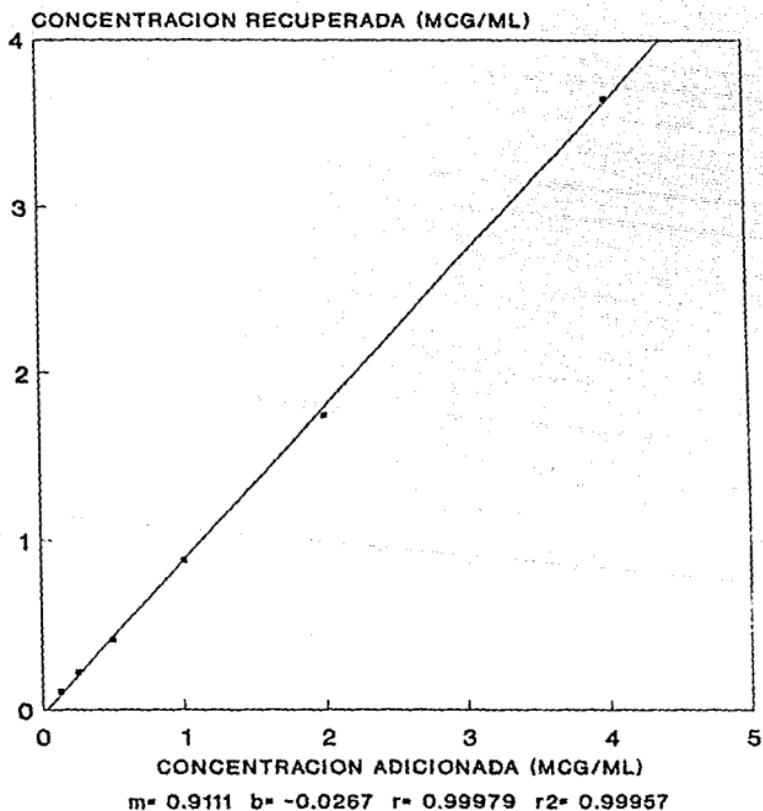


FIGURA 7. Valores promedio de concentración adicionada vs. concentración recuperada, de Prazicuantel en plasma.

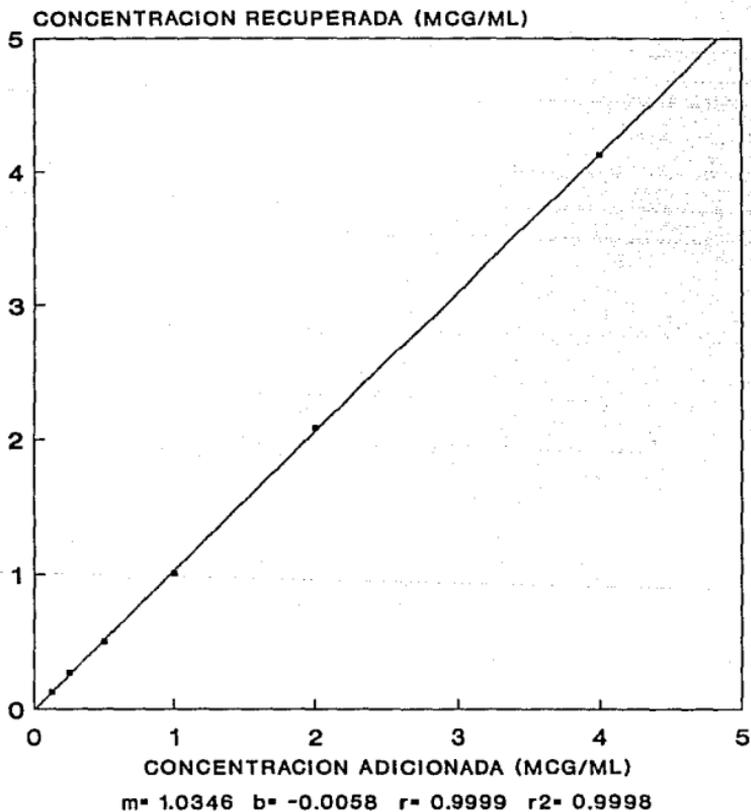


FIGURA 8. Valores promedio de concentración adicionada vs. concentración recuperada, de Prazicuantel en orina.

IV.2.4. - CONCENTRACION MINIMA DETECTABLE.

Al efectuar diluciones de Prazicuantel en el rango de 7.8 a 125 ng/ml en plasma y en orina, se encontró que la concentración mínima detectable para ambos casos fue de 31.2 ng/ml.

En la figura 9 se presentan los cromatogramas correspondientes a la concentración mínima detectable, en ambos fluidos biológicos.

IV.2.5. - SELECTIVIDAD.

En la figura 10 se presenta un cromatograma típico de una muestra plasmática conteniendo Prazicuantel y un blanco plasmático sin fármaco, en el cual se observa que no existen interferencias para la determinación del Prazicuantel.

En la figura 11 se presenta un cromatograma típico de una muestra de orina con Prazicuantel y un blanco de orina sin fármaco en el cual no se observan interferencias que afecten la determinación del Prazicuantel.

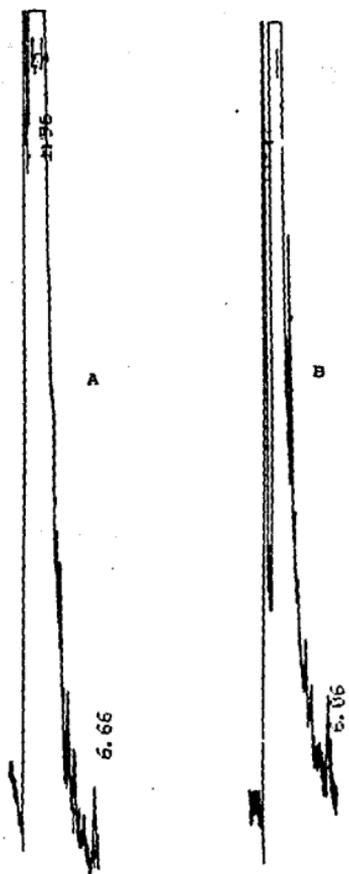


FIGURA 9. Cromatogramas de concentración mínima detectable de Prazicuantel en plasma (31.2 ng/ml)(A) y en orina (31.2 ng/ml)(B)

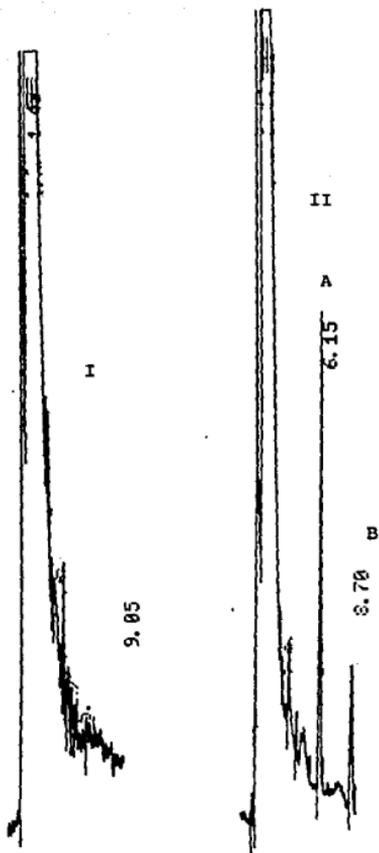


FIGURA 10. Cromatogramas de plasma blanco (I) y plasma adicionado (II) con Prazicuantel 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (A) y estandar interno (0.250 $\mu\text{g/ml}$) (B).

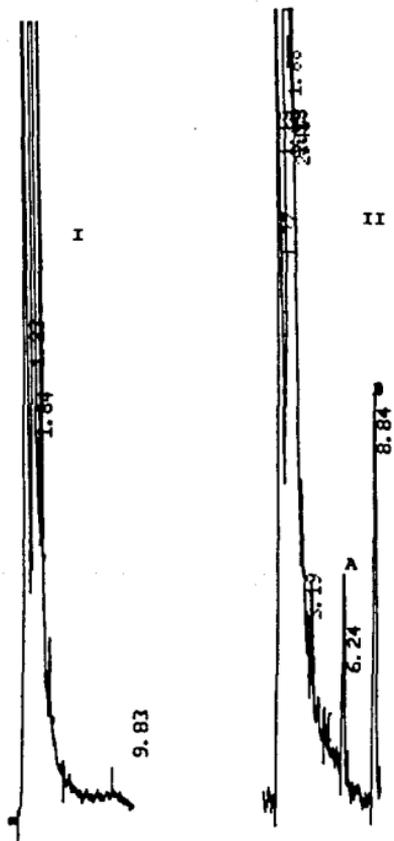


FIGURA 11. Cromatogramas de orina blanco (I) y orina adicionada (II) con Prazicuantel 0.125 µg/ml (A) y estandar interno 0.250 µg/ml (B).

IV.2.6. - TOLERANCIA DEL METODO.

En la tabla XIII se presentan los porcentajes de extracción al utilizar diferentes proporciones de fase móvil, tanto en plasma como en orina.

Se inyectaron muestras en diferentes columnas, y se observó que el porcentaje de extracción era semejante, por lo que el método analítico resulta tolerable al cambio de columnas.

Se observó que al aumentar la proporción de agua en la fase móvil, el tiempo de retención del Prazicuantel aumentaba y el pico se observaba mas achatado, pero fue necesario utilizar una fase móvil con un 45% de acetonitrilo y un 55% de agua para evitar que los componentes de los fluidos biológicos interfirieran en el análisis.

Tabla XIII. Influencia de la fase móvil en la cuantificación de Prazicuantel en fluidos biológicos.

a) Influencia de la fase móvil en el porcentaje de extracción del Prazicuantel en muestras de plasma.

Proporción de fase móvil ACN/H ₂ O	% de extracción
40:60	77.44
45:55	87.49
50:50	87.78
55:45	73.18
60:40	77.10

b) Influencia de la fase móvil en el porcentaje de extracción del Prazicuantel en muestras de orina.

Proporción de fase móvil ACN/H ₂ O	% de extracción
40:60	75.18
45:55	75.18
50:50	77.02
55:45	75.37
60:40	76.07

Se observa una mayor recuperación en la fase móvil ACN/H₂O 45:55 en plasma y los picos a pesar de observarse algo achatados no presentaban coleos con esta fase en plasma ni en orina, por lo cual fue la utilizada en este estudio.

Al efectuar estos análisis no se utilizó estándar interno por lo cual es posible que los porcentajes de recuperación en la orina se hayan visto disminuidos.

IV.2.7.- ESTABILIDAD.

En la tabla XIV. se muestran los resultados de estabilidad para muestras plasmáticas y de orina, a -10°C (congelación) y 3°C (refrigeración).

Tabla XIV.- Estabilidad de las muestras, en refrigeración (3°C) y en congelación (-10°C).

a) Estabilidad en muestras plasmáticas.

	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	% de extracción		
		inicial	semana 1	semana 3
R	0.125	100.45	97.78	72.93
E	0.125	93.24	90.78	85.29
F	4.000	92.65	90.44	72.13
R	4.000	94.57	97.30	73.33

C	0.125	100.45		72.02
O	0.125	93.24		84.15
N	4.000	92.65		68.94
G	4.000	94.57		71.52

b) Estabilidad en muestras de orina.

	Conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	% de extracción				
		inicial	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4
R	0.125	85.56	85.00	86.09	88.81	70.79
E	0.125	77.19	82.58	87.51	85.07	71.19
F	4.000	83.34	85.77	88.85	87.12	66.28
R	4.000	82.78	88.62	78.36	85.70	67.21

C	0.125	85.56	-	79.77	56.37	-
O	0.125	77.19	78.79	76.98	65.35	42.95
N	4.000	83.34	72.73	74.79	53.87	14.85
G	4.000	82.78	74.34	74.78	62.67	16.69

CAPITULO V

ANALISIS DE RESULTADOS

Considerando que el Prazicuantel es un fármaco de gran eficacia, que no ha sido extensamente estudiado y que existen en la literatura pocos reportes de métodos analíticos para cuantificar este fármaco en fluidos biológicos, en el presente trabajo se desarrolló un método sencillo y rápido para la cuantificación de este fármaco tanto en plasma como en orina.

A continuación se analizan los resultados obtenidos de la validación del método analítico.

V.1. VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE PRAZICUANTEL EN PLASMA.

V.1.1. LINEARIDAD.

El método presentó una linealidad satisfactoria (Tabla I), ya que los valores de los coeficientes de correlación fueron mayores a 0.99 y los coeficientes de determinación fueron mayores a 0.98 y los valores de interceptos se acercaron a cero.

Con el fin de determinar si existen diferencias entre las pendientes se procedió a calcular el coeficiente de variación, encontrándose que el valor fue de 0.87%, lo que indica que no existen diferencias entre las mismas.

Así mismo se prepararon algunas curvas patrón sin estandar interno encontrándose que la linealidad era también adecuada, por lo que si no se cuenta con el estandar interno, es posible utilizar el método.

V.1.2. REPETIBILIDAD.

De acuerdo a los resultados presentados en las tablas III, IV y V, se observa que los valores de coeficientes de variación se encuentran entre 1.80 y 9.74 % por lo que el método analítico es repetible en plasma, tanto en un día como en días diferentes.

Con el fin de establecer las fuentes de variación del método y dado que el mismo fué desarrollado por un solo analista, se efectuó un análisis de varianza (ANAEVA) por 2 vías con un criterio de clasificación utilizando los resultados obtenidos en la tablas III, IV y V. Los resultados se presentan en la tabla XV.

Tabla XY.- Análisis de varianza de dos vías para evaluar la repetibilidad del método analítico para la cuantificación de Prazicuantel en plasma.

Fuente de variación	grados de libertad	suma de cuadrados	media de cuadrados	F calculada	F 0.05
Curva (C)	2	613.35	306.68	6.16	16.04
Día (D)	3	149.35	49.78	2.44	3.59
Error (E)	30	613.22	20.44		
Total (T)	35	1375.92			

Repetibilidad del método analítico = $\pm (MCE)^{1/2} = \pm (20.44)^{1/2}$

Repetibilidad del método analítico en plasma = ± 4.5211 .

De acuerdo a los valores de F calculados se observa que no existen diferencias significativas tanto entre curvas como entre días, por lo que el método es repetible.

V.1.3. EXACTITUD.

Al calcular el coeficiente de variación total para cada día, se encontró que los valores fueron de 7.78 y 6.31 respectivamente. Los coeficientes de variación obtenidos indican que el método es lo suficientemente preciso para realizar estudios

biofarmaceuticos y farmacocinéticos ya que se encuentra dentro de los límites de aceptación (coeficiente de variación estandar \leq 10%), en las concentraciones trabajadas (0.125 a 4.0 mcg/ml).

Con respecto a la figura 7, en la que se graficó la concentración adicionada vs. concentración recuperada, se puede observar que el coeficiente de determinación es mayor a 0.98, y el intercepto es aproximadamente 0, por lo que cumple con los criterios de linealidad. Así mismo dado que la pendiente tiene el valor de aproximadamente 1.0, por lo tanto la extracción del Prazicuantel utilizando este método es buena.

V.1.4. CONCENTRACION MINIMA DETECTABLE.

Con el criterio de obtener una respuesta de 2 veces el nivel del ruido del sistema cromatográfico se encontró que en plasma la concentración mínima detectable de Prazicuantel es de 31.2 ng/ml. En estudios previos de farmacocinética (39) se ha demostrado que los niveles de Prazicuantel en plasma se encuentran en el rango estudiado (0.048 - 1.319 μ g/ml), por lo que el método puede ser utilizado en este tipo de estudios.

V.1.5. SELECTIVIDAD.

Al comparar los cromatogramas de plasma sin fármaco y conteniendo Prazicuantel (Figura 10), se puede observar que la selectividad del método es buena ya que no se registran componentes del plasma que interfirieran en el análisis.

Para el desarrollo del trabajo no fue posible conseguir los metabolitos del Prazicuantel. De acuerdo a los datos de la literatura se han identificado 17 metabolitos hidroxilados (20). Considerando que los metabolitos son mas polares que el Prazicuantel, es probable que los mismos no interfieran en el análisis.

V.1.6. TOLERANCIA DEL METODO.

Dado que al inyectar las muestras plasmáticas en columnas diferentes, los porcentajes de recuperación fueron semejantes; el método tolera el cambio de columnas.

Los valores de por ciento de extracción obtenidos al variar la fase móvil (Tabla XII) indican que con la mezcla ACN/H₂O 45:55, la recuperación del fármaco era mayor.

Así mismo se encontró que al disminuir la proporción de agua dentro de la fase móvil, el tiempo de retención era mas corto y los picos se acercaban mucho a los de los componentes endógenos del plasma, por lo que no es recomendable variar la fase móvil.

V.1.7. ESTABILIDAD.

Para determinar la estabilidad del Prazicuantel en plasma, (Tabla XIV), se efectuó un análisis de varianza (Tabla

XVI) para obtener un intervalo de confianza y un factor I promedio, para cada condición/tiempo/ y determinar si se cumplen con los criterios.

Tabla XVI. Análisis de varianza para el intervalo de confianza para cada condición/tiempo/ en de estabilidad de Prazicuantel en plasma.

	Inicial	R 1 ^{ra} semana	R 3 ^{ra} semana	C 3 ^{ra} semana
\bar{y}	95.23	95.59	75.92	74.15
s^2	12.73	10.53	39.27	46.20
sp^2		7.75	17.33	19.64
IC		-6.15 a 6.85	-29.03 a -9.59	-31.43 a -10.73

$$\text{Varianza ponderada } sp^2 = \frac{2s_o^2 + 2s_l^2}{2(c+1)}$$

$$\text{Intervalo de confianza IC} = (\bar{y}_t + \bar{y}_o) \pm t^* \sqrt{sp^2 (2/3)}$$

Tabla XVII. Cálculo del factor I en el Análisis de varianza para cada condición/tiempo/ en estabilidad de Prazicuantel en plasma.

Factor	R 1 ^{ra} semana	R 3 ^{da} semana	C 3 ^{ra} semana
I ₁	97.34	72.60	71.70
I ₂	97.36	91.47	90.25
I ₃	104.09	77.85	74.19
I ₄	102.89	77.54	75.63
- I	100.42	79.87	77.94

De acuerdo a las especificaciones, la muestra es estable en condiciones de refrigeración durante 1 semana ya que el I.C. incluye el valor de cero y el valor de la media de I se encuentra dentro del rango del 90 al 110%, que son los criterios establecidos para fluidos biológicos. La muestra no es estable en refrigeración por mas de 1 semana, ya que no se cumplen con los requisitos.

Con respecto a las condiciones de congelación, es necesario hacer un mayor número de estudios, ya que las muestras no resultaron ser estables, esto puede deberse a que bajo estas condiciones los componentes plasmáticos se precipitan y probablemente el Prazicuantel sea retenido junto con los mismos y de esta manera al pasar por el cartucho sep-pak la concentración se vea disminuida sin que probablemente afecte al fármaco.

V.2. VALIDACION DEL METODO ANALITICO PARA LA CUANTIFICACION DE PRAZICUANTEL EN ORINA.

V.2.1. LINEARIDAD.

Los resultados presentados en la tabla II, indican que el método utilizado en la cuantificación de Prazicuantel en orina, es lineal en el intervalo de concentraciones estudiadas (0.125 a 4.0 $\mu\text{g/ml}$), con un coeficiente de correlación promedio de 0.99990 y un valor de $r^2 = 0.9998$. Con el fin de determinar si existían diferencias entre las pendientes se obtuvo su coeficiente de variación, encontrándose un valor de 3.0%. De acuerdo a este valor no existen diferencias entre las pendientes; además de que el valor promedio del intercepto es muy cercano a cero.

Así mismo se prepararon muestras sin el estándar interno encontrándose una buena linealidad.

V.2.2. REPETIBILIDAD.

En las tablas VI y VII, se puede observar que los coeficientes de variación son bajos ($\leq 10\%$), por lo que el método se considera repetible en el rango de concentraciones estudiado (0.125 a 4.0 $\mu\text{g/ml}$) y es preciso para utilizarlo en los estudios para los cuales fué desarrollado.

Para definir las fuentes de variación del método analítico en su repetibilidad, se obtuvo el coeficiente de variación total para cada día, en base a las tablas VI y VII y dado que el método fue desarrollado por un solo analista, se procedió a realizar un Análisis de varianza (Tabla XVIII), tomando en cuenta los resultados obtenidos en las tablas VI y VII.

Tabla XVIII. Análisis de varianza de 2 vías para evaluar la repetibilidad del método analítico para cuantificar Prazicuantel en orina.

Fuente de variación	grados de libertad	suma de cuadrados	media de cuadrados	F calculada	F 0.05
Curva (C)	2	448.16	223.08	5.69	16.04
Día (D)	3	6.03	2.01	0.051	3.59
Error (E)	30	1175.76	39.19		
Total (T)	35	1697.25			

$$\text{Repetibilidad del método analítico} = \pm (MCE)^{1/2} = (39.19)^{1/2}$$

$$\text{Repetibilidad del método analítico en orina} = \pm 6.2602.$$

De los resultados presentados en la tabla XVIII se encontró que no existen diferencias significativas, ya que los valores teóricos son mayores a los calculados; por lo que el método analítico es repetible tanto en 1 día como en diferentes días.

V.2.3. EXACTITUD.

Ya que los coeficientes de variación presentados en la Tabla X son menores al 10%, el método para cuantificar el Prazicuantel en orina es exacto.

En la figura 8 se observa también la linealidad del método analítico donde el coeficiente de determinación r^2 es $0.9998 > 0.98$, el intercepto es aproximadamente igual a cero y el valor de la pendiente de 1.03486, por lo que cumplen los criterios de linealidad.

V.2.4. CONCENTRACION MINIMA DETECTABLE.

Tomando en cuenta que la concentración mínima detectable es el valor del ruido del sistema cromatográfico multiplicado por 2, se encontró que este valor para el método desarrollado en orina es de 31.2 ng/ml, lo que lo hace útil en estudios urinarios ya que los niveles encontrados en orina generalmente son más altos que los de plasma.

V.2.5. SELECTIVIDAD.

La selectividad del método analítico en orina está de acuerdo a los requerimientos ya que como se observa en la figura 11

no existen componentes de la orina que interfieran en el análisis de Prazicuantel en orina.

V.2.6. TOLERANCIA.

Ya que la recuperación del Prazicuantel en orina se mantiene constante al utilizar diferentes columnas, el método es tolerante al cambio de columnas.

En la figura XIII se muestra la tolerancia del método al cambio de la fase móvil. Dado que los porcentos de recuperación son semejantes a los obtenidos al usar la fase móvil con la cual se validó el método (ACN/H₂O 45:55), una variación en la proporción de la fase móvil, no interfiere grandemente en el análisis.

V.2.7. ESTABILIDAD.

Para verificar la estabilidad del Prazicuantel en orina, se realizó un análisis de varianza para obtener un intervalo de confianza y un factor I para cada condición/tiempo/muestra, tomando los resultados obtenidos en la tabla XIV. Los resultados se presentan en la Tabla XIX y XX.

Tabla XIX. Resultados del cálculo del intervalo de confianza y del factor I para cada condición/tiempo en el estudio de estabilidad del Prazicuantel en orina.

	Inicial	R 1 ^{ra} semana	R 2 ^{ra} semana	R 3 ^{ra} semana	R 4 ^{ra} semana
\bar{y}	82.22	85.49	85.20	86.68	88.87
s^2	12.68	6.20	22.08	2.76	6.18
sp^2		5.26	11.59	5.15	6.29
IC		-2.1 a 8.6	-5.0 a 10.9	-0.8 a 9.7	-19 a -7.5

Factor	R 1 ^{ra} semana	R 2 ^{da} semana	R 3 ^{ra} semana	R 4 ^{ra} semana
I ₁	99.35	100.62	103.80	82.74
I ₂	106.98	113.37	110.21	92.23
I ₃	102.92	106.61	104.54	74.73
I ₄	107.06	94.66	103.53	81.19
\bar{I}	104.08	103.82	105.52	83.92

En base a los resultados obtenidos del análisis estadístico (Tabla XIX) se encontró que las muestras de orina son estables en condiciones de refrigeración por 3 semanas ya que sus intervalos de confianza incluyen el valor de cero como lo establecen los requerimientos y los valores medios del factor I cumplen con el criterio del 90 al 110% para fluidos biológicos, lo cual indica que las muestras de orina pueden guardarse hasta 3 semanas máximo antes de realizar su análisis.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Tabla XX. Resultados del cálculo del intervalo de confianza y del factor I para cada condición/tiempo en el estudio de estabilidad del Prazicuantel en orina.

	Inicial	C 1 ^{ra} semana	C 2 ^{ra} semana	C 3 ^{ra} semana	C 4 ^{ra} semana
\bar{y}	82.22	75.29	76.58	59.57	24.83
s^2	12.68	9.86	5.59	28.58	247.10
sp^2		7.51	6.09	41.26	259.78
IC		-0.53 a 0.53	-11 a 0.12	-38 a 7.65	-95 a -20

Factor	C 1 ^{ra} semana	C 2 ^{da} semana	C 3 ^{ra} semana	C 4 ^{ra} semana
I ₁	-	93.23	65.88	-
I ₂	102.76	99.73	64.66	55.64
I ₃	87.27	89.74	64.64	17.82
I ₄	89.80	90.34	75.71	20.16
- I	93.05	93.26	72.72	31.21

Al efectuar el análisis para los valores de porcentaje de extracción obtenidos en el estudio de muestras mantenidas en congelación en la tabla XX, se observa que la muestra es estable bajo estas condiciones por solo 2 semanas, ya que la 3ra y 4ta no cumplen con los requisitos establecidos. A pesar de que en condiciones de congelación se esperaría una mayor estabilidad de las muestras; los resultados encontrados en este trabajo pueden explicarse tomando en cuenta que en condiciones de congelación los componentes de la orina formaban un precipitado en el cual podría haber estado incluido el Prazicuantel originando que la

recuperación disminuyera. Se requiere un mayor número de estudios de estabilidad del Prazicuantel en orina ya que los resultados no fueron los esperados.

V.3. COMPARACION ENTRE EL TRATAMIENTO DE MUESTRAS PLASMATICAS Y DE ORINA.

Debido a las características individuales de los fluidos biológicos manejados en el transcurso de este trabajo, se encontraron algunas diferencias que es importante considerar para el tratamiento de las muestras.

Se observaron mayores problemas en el manejo de muestras plasmáticas que en las de orina, debido a que el plasma es un líquido de mayor viscosidad que la orina y esto ocasiona problemas de gran cantidad de espuma al agitar las muestras y al pasarias a través del cartucho sep-pak. Esta espuma dificulta pipetear la muestra con exactitud.

Para ambos fluidos se presenta el problema de precipitación de componentes del fluido cuando este no se utiliza inmediatamente, lo que se considera que es el factor que influyó en los estudios de estabilidad y por lo que no se obtuvieron resultados semejantes a los reportados en la literatura. (8) (50)

El Prazicuantel se cuantificó en ambos fluidos biológicos por alturas debido a que el pico se observa coleado en algunas ocasiones y esto origina variaciones en los resultados.

Debido a que el trabajo fue realizado por un solo analista no se determinó el parámetro de reproducibilidad.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que el método analítico desarrollado resulto ser:

- Lineal, tanto en plasma como en orina, en el rango de concentraciones de 0.125 a 4.0 $\mu\text{g/ml}$ que son los niveles encontrados en pacientes, bajo tratamiento con 50 mg/kg de Prazicuantel.

- Repetible tanto en un día como en varios días cuando el estudio lo realiza un solo analista, esto aplica tanto a plasma como a orina.

- Exacto en el rango de concentraciones de 0.125 a 4.0 $\mu\text{g/ml}$ tanto en plasma como en orina.

- Sensible ya que tanto para plasma como para orina la concentración mínima detectable es de 31.2 ng/ml.

- Selectivo, tomando en cuenta que no se presentaron interferencias del fluido que alteraran el estudio.

- Tolerante al cambio de columnas y a la variación de la fase móvil en el caso de orina.

Las ventajas del método son:

Sencillo ya que no requiere de un tratamiento complicado de las muestras.

Rápido. Se puede trabajar hasta un promedio de 30 muestras diarias.

En base a los parámetros antes mencionados y con los cuales cuenta el método desarrollado se puede recomendar el uso del mismo para estudios de farmacocinética, biodisponibilidad y toxicidad.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Aliya A. et al., Cisticercosis. Una Recopilación Actualizada de los Conocimientos Básicos para el Manejo y Control de la Cisticercosis Causada por la *Taenia solium*, Ed. Biblioteca de la Salud., México (1987).
- 2.- Andrews P., Thomas H., J. Parasitol., 66 (6), 920 (1980).
- 3.- Billings C.P., Cancer Research., 42, 2692 (1982).
- 4.- Bittencourt P.R.M., Acta Neurol. Scand., 82, 26-33 (1990).
- 5.- Buhring K.U., European J. of Drug Metabolism and Pharmacokinetics., 3, 179 (1978).
- 6.- Castillo del Río M. C. Evaluación de Métodos Analíticos para Cuantificar Prazicuantel en Fluidos Biológicos. Tesis licenciatura. 1984.
- 7.- Coles G.C., Journal of Helminthology., 53, 31 (1979).
- 8.- Chamberlain Joseph. Analysis of Drugs in Biological Fluids. Ed. Library of Congress Cataloging in Publication Data. E.E.U.U. 1987.
- 9.- Chavarría M., Especialidades Veterinarias., 1, 160 (1979).
- 10.- Davis A., Bulletin of the World Health Organization, 57, 767 (1979).
- 11.- Diekmann H.W., European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics. No. 2, 107 (1976).

12. - Diekmann H.W., European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics., 2, 107 (1979).

13. - Elliot P., Biochem. J., 125, 106 (1971).

14. - Feng Z., Environ. Mutagenesis., 30, 390 (1981).

15. - Fetterer H.R., European J. of Pharmacology., 64, 31 (1980).

16. - Froberg H., Salud Publica de Mexico., 24, 605 (1982).

17. - Galindo U., Salud Publica de Mexico., 24, 679 (1982).

18. - Gao Hongtei, Yaowu Fenix Zazhi., 4, 144 (1984).

19. - Gemell M.A., Research in Veterinary Science., 29, 131 (1980).

20. - Hag Ali Mohammed., Biomedical and Environmental Mass Spectrometry., Vol. 19, 179-185 (1990).

21. - Hirtz J., Biopharmaceutics and Drug Disposition., Vol. 7, 315-326 (1986).

22. - Ishizaki. T., Bulletin of the World Health Organization., 57, 787 (1979).

23. - Jung Helgi., Clinical Neuropharmacology., Vol. 13, No. 6, 559-564 (1990).

24. - Jung H., Proc. West. Pharmacol. Soc., 34, 335-340 (1991).

25. - Katz N., Bulletin of de World Health Organization., 57, 787 (1979).

26. - King Charles H., M.D., Annals of Internal Medicine., 110, 290-296 (1989).

27. - Kraak J.C., Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division) 123-125 (1987).

- 28.- Leopold G., European Journal Clin. Pharmacol., 14, 281 (1978).
- 29.- Lieshout Lisette Van., American Journal Med. Hyg., 44, 3, 323-328 (1991).
- 30.- Mader E.E., Pharmaceutical and Chemical Synonyms., Pag. 407, Excerpta Medica, 7a. edicion (1983).
- 31.- Mandour Mohammed El M., Transactions of the Rpyal Society of Tropical Medicine and Hygiene., 84, 389-393 (1990).
- 32.- Marshall I., Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 75, 115 (1982).
- 33.- Martinalde W., The Extra Pharmacopoeia., 29a. ed., The Pharmaceutical Press., Londres (1989).
- 34.- Mc. Nair Harold M., Cromatografia Liquida de Alta Presion. 2a. ed., Organizacion de los Estados Americanos., Washington D.C., (1980).
- 35.- Mostafa H.M., Biochemical Pharmacology., Vol. 38, No. 2, 251-259 (1989).
- 36.- Patzchke R., European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics., 3, 149 (1979).
- 37.- Pearson Richard D. M.D., Annals of Internal Medicine., 99, 195-198 (1983).
- 38.- Putter J.J., Eur. Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics., 4, 193 (1978).
- 39.- Putter J.J., European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics., 3, 143 (1979).
- 40.- Robles C., Gaceta Medica Mexicana., 117, 355 (1982).

- 41.- Santos A., Bulletin of the World Health Organization., 57, 793 (1979).
- 42.- Seed L.J., Mutagenesis and Teratogenesis 2505.
- 43.- Seubert J., Experientia., 13, 1038 (1977).
- 44.- Spina Franca A., Arq. Neuro-Psiquiatria., Vol. 43, No. 3, sept (1985).
- 45.- Steiner K., European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics., 2, 85 (1976).
- 46.- Steiner K. European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics., 2, 97, (1976).
- 47.- Takur S.A., Experimental Parasitology., 47, 131 (1979).
- 48.- Uihlein M., Practice of High Performance Liquid Chromatography, Aplicacions, Equipement and Quantitative Analysis., Ed. by H. Engelhardt.
- 49.- USP DI., pag. 1810.
- 50.- Vasquez Ramirez Ma. Luisa. Introducci3n a la Farmacocin3tica del Prazicuantel con Dexametazona. Tesis maestría. 1987.
- 51.- Williams K., Biomedicina y Salud., 3, marzo (1986).
- 52.- Wu Ming-He., American Journal Trop. Med. Hyg. 3, 45, 345-349, (1991).
- 53.- Xiao Shu-Hua., Journal of Chromatography., 275, 127 (1983).
- 54.- Xiao Shu-Hua., Journal of Parasitology., 77, 2, 241-245 (1991).