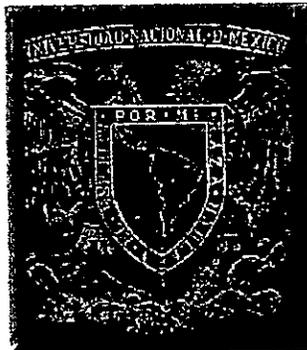


00563
2
2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



**Facultad de Química
División de Estudios de Posgrado**

Farmacocinética del α BIOF10 en Borregos

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN FARMACIA (BIOFARMACIA)**

PRESENTA:

QFB Lauro Misael del Rivero Ramírez

Cd. Universitaria 1998



265605
**TESIS CON
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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Primer vocal: M. en C. Inés Fuentes Noriega
Secretario: M. en C. Guadalupe Clara Espinosa Martínez
Primer suplente: M. en C. Ma. Teresa Francisco Doce
Segundo suplente: M. en C. Francisco Hernández Luis

Sitio donde se desarrollo el tema:

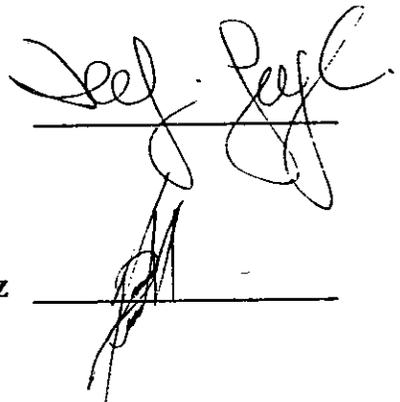
Laboratorio de Biofarmacia del Departamento de Farmacia
División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM

Asesor:

Dra. Helgi Jung Cook

Sustentante:

QFB Lauro Misael del Rivero Ramírez



Two handwritten signatures are present. The first signature, on the left, is written over a horizontal line and appears to be 'Helgi Jung Cook'. The second signature, on the right, is written over a horizontal line and appears to be 'Lauro Misael del Rivero Ramírez'. The signatures are in black ink and are somewhat stylized.

II

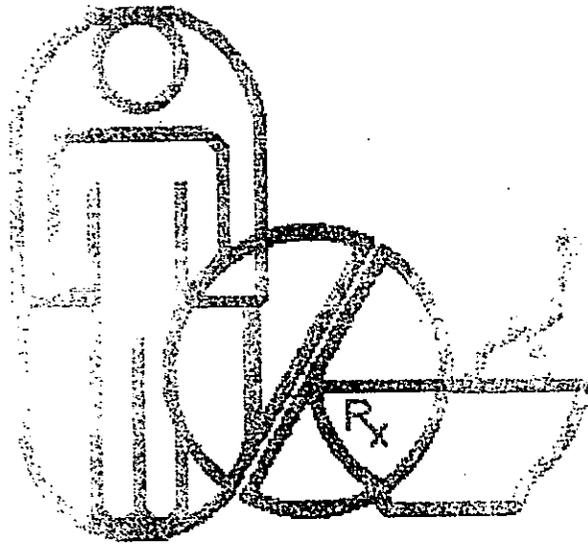
Presidente
Primer vocal
Secretario
Primer suplente
Segundo suplente

III

Laboratorio de Biotecnología
División de Estudios

Asesor
Dra. Helga Jung

Estadística
Dra. Lucía Maza



Biotarmada

Resumen

Se realizó un estudio para evaluar la farmacocinética de un nuevo agente fasciolicida: el α BIOF10 en borregos, el cual ha demostrado ser efectivo tanto *in vitro* como *in vivo*.

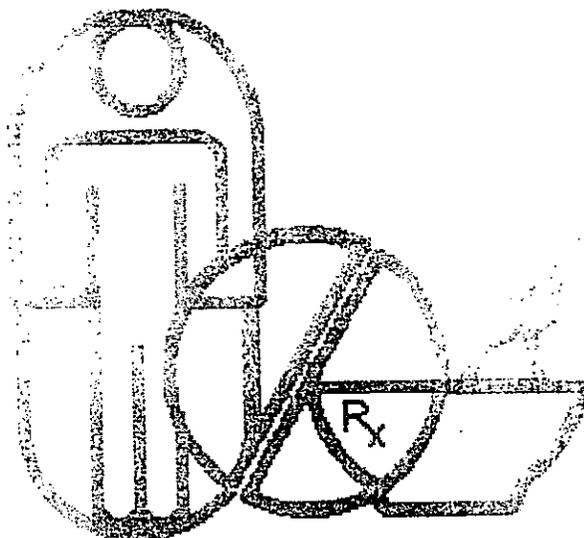
El estudio se realizó en tres etapas. En la *Etapa 1* se determinaron las propiedades del α BIOF10 encontrándose que la especie protonada es un ácido débil con un pKa de 2.87, es prácticamente insoluble en casi todas las soluciones acuosas y orgánicas, y presenta un coeficiente de partición lípido/agua de 27.63, dado estos resultados se esperaría el fármaco se absorba lentamente sobre todo en el estómago.

La *Etapa 2*, consistió en desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos para la determinación del α BIOF10 y su metabolito en plasma y orina de borrego, el cual probó que es adecuado y confiable para la cuantificación de los analitos en los fluidos biológicos.

En la *Etapa 3*, se administró una suspensión de α BIOF10 por vía oral a 7 borregos a una dosis de 12 mg/Kg y se tomaron muestras sanguíneas a las 0 (blanco), 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36, 48, 72, 96, 102, 144 y 168 horas después de su administración. Se observó que el α BIOF10 sufre efecto del primer paso metabolizándose rápidamente a sulfóxido de α BIOF10 (SO α BIOF10). El SO α BIOF10 se ajusta a un Modelo Abierto de Dos Compartimientos, con una vida media de absorción de 6.17 horas, vida media de eliminación de 18.95 horas, concentración plasmática máxima de 8.0 μ g/mL, tiempo para llegar a la concentración plasmática máxima de 11.4 horas, un área bajo la curva de 238.39 μ g*h/mL, un volumen de distribución de 58.57 L y una depuración de 68.76 mL/min.

Los resultados obtenidos en el estudio farmacocinético conjuntamente con los de eficacia *in vitro* e *in vivo*, indican que el α BIOF10 podría ser considerado como una alternativa en el tratamiento de la fascioliasis animal.





Biofarmaco

Indice

Indice	i
Indice de tablas	iii
Indice de figuras	iv
I. Introducción	1
II. Generalidades	5
II.1 Fascioliasis	7
II.1.1 Ciclo biológico	7
II.1.2 Clasificación	9
II.1.3 Diagnóstico	10
II.1.4 Patología Clínica	11
II.1.5 Importancia médica y económica	12
II.1.6 Control y tratamiento	14
II.1.7 Mecanismo de acción de los bencimidazoles	19
II.2 Triclabendazol como agente fasciolicida	20
II.3 α BIOF10 como agente fasciolicida	25
II.4 Propiedades del α BIOF10	27
III. Parte Experimental	29
III.1 Determinación de las propiedades fisicoquímicas	31
III.1.1 pKa	31
III.1.2 Solubilidad	31
III.1.3 Coeficiente de partición	32
III.2 Desarrollo del método analítico para la cuantificación del α BIOF10 en fluidos biológicos	33
III.2.1 Preparación de la solución de prueba del α BIOF10 para el desarrollo del método	33
III.2.2 Selección de la fase estacionaria y la fase móvil	33
III.3 Método analítico para la cuantificación del α BIOF10 y el sulfóxido de α BIOF10 en plasma y orina de borrego	36
III.3.1 Condiciones cromatográficas	36
III.3.2 Preparación de la curva de calibración en fluidos biológicos	37
III.3.3 Procedimiento	38
III.4 Validación	39
III.4.1 Especificidad	39
III.4.2 Linealidad	40
III.4.3 Exactitud y precisión	40
III.4.4 Límite de cuantificación (CMC) y Límite de detección (CMD)	41
III.4.5 Estabilidad	41
III.5 Estudio de Farmacocinética en Borregos	42
III.5.1 Etapa I. Estudio preliminar	42
III.5.2 Etapa II. Estudio de Farmacocinética	43



IV. Resultados y Análisis	45
IV.1 Determinación de las propiedades fisicoquímicas	47
IV.1.1 pKa	47
IV.1.2 Solubilidad	50
IV.1.3 Coeficiente de partición	51
IV.2 Desarrollo del método analítico para la cuantificación del α BIOF10 en fluidos biológicos	52
IV.2.1 Selección de la columna y de la fase móvil	52
IV.2.2 Selección del estándar interno	53
IV.2.1 Selección del proceso de extracción	54
IV.3 Validación del Método Analítico para la cuantificación del α BIOF10 y SO α BIOF10 en plasma y orina de borrego	54
IV.3.1 Especificidad	54
IV.3.2 Linealidad	56
IV.3.3 Exactitud y precisión	58
IV.3.4 Limite de cuantificación (CMC) y Limite de detección (CMD)	58
IV.3.5 Estabilidad	60
IV.4 Estudio de Farmacocinética en Borregos	61
IV.4.1 Etapa I. Estudio preliminar	61
IV.4.2 Etapa II. Estudio de administración oral	63
V. Conclusiones	67
VI. Apéndices	71
VI.1 Apéndice A	73
VI.2 Apéndice B	73
VI.3 Apéndice C	75
VII. Bibliografía	79
Agradecimientos	85



Indice de tablas

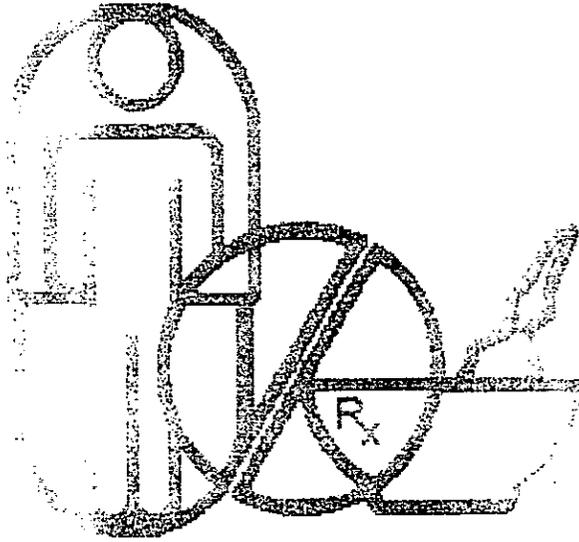
Tabla 2.1	Diversos bencimidazoles desarrollados para el tratamiento de la <i>Fasciola hepatica</i>	16
Tabla 2.2	Espectro de eficiencia de fármacos a dosis recomendadas contra <i>Fasciola hepatica</i> en borregos	18
Tabla 2.3	Parámetros farmacocinéticos del sulfóxido de triclabendazol en diferentes especies animales	23
Tabla 2.4	Parámetros farmacocinéticos de la sulfona de triclabendazol en diferentes especies animales	24
Tabla 2.5	Actividad biológica <i>in vitro</i> del compuesto α BIOF10	25
Tabla 2.6	Actividad biológica en borregos del α BIOF10 sin formulación alguna	26
Tabla 2.7	Actividad biológica <i>in vivo</i> del α BIOF10	27
Tabla 3.1	Diseño de experimentos para seleccionar la fase estacionaria	34
Tabla 3.2	Diseño experimental para la selección de la fase móvil	35
Tabla 3.3	Diseño experimental para la selección de la fase móvil. Aumento de la superficie de respuesta	35
Tabla 4.1	Solubilidad del α BIOF10	51
Tabla 4.2	Parámetros obtenidos en la evaluación de la linealidad del método	56
Tabla 4.3	Exactitud y precisión del método en plasma y orina de borrego	59
Tabla 4.4	Estabilidad del α BIOF10 y SO α BIOF10 a corto plazo	60
Tabla 4.5	Estabilidad del α BIOF10 y SO α BIOF10 a largo plazo	60
Tabla 4.6	Estabilidad del α BIOF10 y SO α BIOF10 con ciclos de congelación – descongelación	61
Tabla 4.7	Concentraciones plasmáticas del SO α BIOF10 a los diferentes tiempos de muestreo después de la administración de una dosis de 12 mg/Kg. del α BIOF10 por vía oral a un borrego	62
Tabla 4.8	Valores promedio de concentración plasmática del SO α BIOF10 después de la administración de una dosis de 12 mg/Kg. del α BIOF10 por vía oral a borregos	64
Tabla 4.9	Parámetros farmacocinéticos promedio \pm d.e. del SO α BIOF10 obtenidos después de la administración oral de α BIOF10 en 7 borregos	65



Índice de figuras

Figura 2.1.	Ciclo biológico de la <i>Fasciola hepatica</i>	9
Figura 3.1	Preparación de la curva de calibración del α BIOF10 y SO α BIOF10 en fluidos biológicos	38
Figura 3.2	Esquema del método de extracción empleado para el α BIOF10 y SO α BIOF10 en fluidos biológicos	39
Figura 4.1	Espectros de absorción de las disoluciones de α BIOF10 procedentes de los diferentes valores de pH	48
Figura 4.2	Determinación del pKa del α BIOF10	50
Figura 4.3	Superficie de respuesta para la selección de la columna cromatográfica y de la fase móvil a y b	52
Figura 4.4	Determinación de la longitud de onda de máxima absorción	53
Figura 4.5	Selección del estándar interno	53
Figura 4.6	Cromatogramas representativos	55
Figura 4.7	Linealidad del método analítico para cuantificar α BIOF10 y SO α BIOF10 en plasma y orina de borrego	57
Figura 4.8	Perfil de concentración plasmática de SO α BIOF10 después de la administración de una dosis de 12 mg/Kg. a un borrego	62
Figura 4.9	Valores promedio \pm d.e. de la concentración plasmática del SO α BIOF10 obtenidos después de la administración oral de α BIOF10 en 7 borregos	64





Biotarmaco

I.

Introducción

La fasciolosis es un problema parasitario con gran repercusión en la industria pecuaria. La presencia de *fasciola* en los tejidos del ganado vacuno, ovino, etc., hace que merme su productividad; ya que una vaca con fasciolosis produce menos leche, lo cual se traduce en una pérdida económica importante. La *Fasciola hepatica* es un parásito que recibe el nombre de eurixeno, por lo que un amplio número de mamíferos puede funcionar como huéspedes definitivos, de tal forma que desde una oveja hasta un elefante puede ser el huésped definitivo, pasando entre ellos el hombre. Este parásito se encuentra localizado en la mayor parte de los estados de la República Mexicana, siendo más frecuente en el ganado vacuno (zona de la cuenca del Río Lerma), con valores que van del 5 al 40%. En situaciones particulares (algunos ranchos) hasta el 100% de las reses están infectadas.

Las infecciones humanas se han reportado en países asiáticos, europeos, africanos y americanos, sin embargo sólo se han reportado varias decenas de casos, quizá debido a que no se han realizado los estudios adecuados para detectar la infección en el hombre. Cuando se detecta un caso humano, se debe estudiar a todos los miembros de la familia, ya que se suele presentar en epidemias familiares.

Considerando lo anterior, en la última década la literatura relacionada con la síntesis de antihelmínticos de amplio espectro, se ha incrementado considerablemente. Los carbamatos benzimidazólicos han demostrado ser altamente eficaces en animales¹, de los cuales algunos de ellos están siendo utilizados en medicina humana². Los benzimidazoles han mostrado ser capaces de eliminar nemátodos adultos, céstodos y fasciolas; sin embargo, no todos estos compuestos son eficaces contra los diversos estadios de los parásitos³.

Uno de los fasciolocidas más relevantes en el mercado nacional es el triclabendazol (Fasinex: Novartis), compuesto benzimidazólico que ha demostrado alta eficacia contra los diferentes estadios de los parásitos^{4,5}, sin embargo, al igual que otros fasciolocidas no relacionados estructuralmente, tales como el closantel (Flukiver: Janssen Pharmaceutica), rafoxanide (Ranide: Merck Sharp and Dhome), clorsulon (Ivomec-f: Merck Sharp and Dhome), nitroxinil (Trodax: Rone Meriex), netobimin (Hapadex: Sheramex)⁶, son todos de importación y de difícil preparación, razón por la cual la fuga de divisas al igual que los costos del tratamiento de los animales son considerablemente altos.

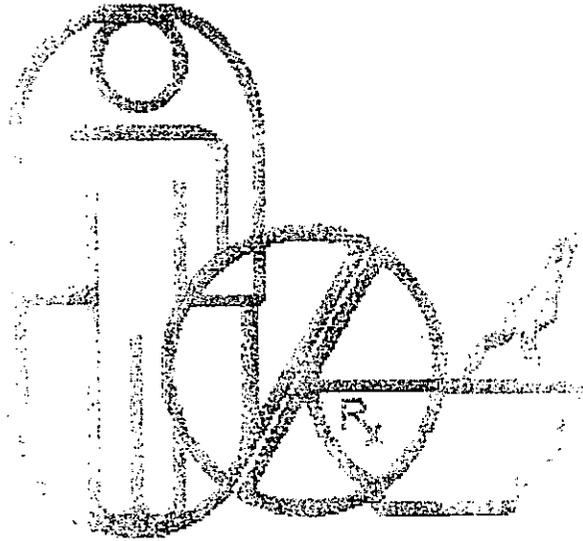
En el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM se ha trabajado en la síntesis de diversos derivados del benzimidazol obteniendo 17 nuevos compuestos. Ibarra y Velarde⁸ sometieron a evaluación preliminar como trematodocidas contra *Fasciolas* inmaduras tempranas⁷ a estos compuestos, utilizando un modelo *in vitro*. Con base en los resultados de actividad fasciolocida obtenidos en los estudios preliminares *in vitro*, se diseñaron y se sintetizaron 5 nuevos compuestos de estructura análoga al triclabendazol, entre ellos el benzimidazol que presenta una



mayor actividad contra *fasciola*. Dos de estos compuestos denominados compuesto α y compuesto β se sometieron a pruebas de actividad fasciolicida *in vitro* contra metacercarias de *Fasciola hepatica* recién desenquistadas, e *in vivo* en borregos y conejos. Las pruebas *in vitro* mostraron alta eficacia para ambos compuestos a dosis de 9 $\mu\text{g/mL}$. Fue de gran interés encontrar que el compuesto α causó lisis de las metacercarias. *In vivo*, el compuesto α mostró eficacia a dosis de 15 mg/Kg equiparable al Triclabendazol, por lo que se consideró necesario continuar con la investigación referente a este nuevo compuesto y por lo tanto desarrollar el presente trabajo, cuyos objetivos fueron:

- Determinar las propiedades fisicoquímicas del αBIOF10
- Caracterizar la farmacocinética del αBIOF10 en borregos





Biotarmaco

II.

Generalidades

II.1 Fascioliasis

La Organización Mundial de la Salud⁹ (OMS) ha clasificado a esta enfermedad como una zoonosis parasitaria con número de registro CIE-9 121.3 y la Organización Panamericana de la Salud (OPS) la define como una “enfermedad del hígado causada por un gran tremátodo que es un parásito natural de los ovinos, bovinos y animales similares, en todo el mundo. Estos tremátodos llegan a medir unos 3 cm, y viven en los conductos biliares. Las formas jóvenes viven en el parénquima hepático, produciendo lesión tisular y hepatomegalia. Durante la fase inicial de la invasión del parénquima puede haber dolor en el cuadrante superior derecho, anomalías en la función hepática y eosinofilia. Las formas adultas e inmaduras del parásito, después de que emigran a los conductos biliares, pueden causar cólico vesicular e ictericia obstructiva”. Los agentes infecciosos son la *Fasciola hepatica* (conocida también como duela o conchuela del hígado) y con menor frecuencia la *Fasciola gigantica*. La distribución geográfica de la *F. hepatica* es a nivel mundial mientras que la *F. gigantica* se encuentra en Africa, varios países de Asia y en Hawai.

II.1.1 Ciclo Biológico

El descubrimiento del ciclo evolutivo de la *Fasciola hepatica* se llevó a cabo en 1873 por Rudolf Leuckart y Sir Algernon Phillips Withiel Thomas quienes trabajando por separado encontraron que¹¹:

La *Fasciola hepatica* en su estado *adulto*, es un gusano plano foliáceo, sin segmentos, carnosos, mide de 2 a 3.5 cm de largo por 1 a 1.5 cm de ancho. Su cuerpo está cubierto de espinas, aunque algunos ejemplares carecen de estas en el extremo posterior el cual es redondeado. La porción anterior o cefálica (cono cefálico) en su vértice presenta la ventosa cefálica o bucal, esta mide aproximadamente 1 mm, en cuyo fondo está la boca o inicio del aparato digestivo el cual se continúa por una faringe bien desarrollada, misma que se bifurca para dar origen a los intestinos que no tienen salida; es por eso que se denominan intestinos ciegos. Es hermafrodita, posee un ovario y un testículo, teniendo por lo tanto autofecundación, con la formación de un cigoto y huevos que permanecen en el útero hasta convertirse en huevos maduros; y ser liberados. El *parásito adulto* normalmente vive en el interior los conductos biliares de los huéspedes definitivos, los cuales son principalmente herbívoros (vacas, borregos, cabras, caballos, burros, conejos, roedores, búfalos, elefantes, e incluso el hombre), ahí el adulto libera los *huevos*.

Los *huevos* miden de 130 a 150 micras de longitud por 60 a 90 micras de ancho, tienen una doble cubierta, los *huevos* son arrastrados con el tránsito del líquido biliar y caen al duodeno donde desemboca la vía biliar, de esta forma los *huevos* llegan al intestino delgado, y son eliminados con la materia fecal del huésped parasitado. Se requiere que el



huésped defeque cerca de un manto de agua. La maduración se efectúa en el agua entre 9 y 15 días a temperatura de 22 a 25°C. El huevo presenta en uno de sus polos el opérculo, que es una especie de tapa, el cual tiene la capacidad de que cuando el embrión está maduro se abre para permitir la salida de este, mismo que se llama *miracidio*.

El *miracidio* es una larva ciliada, que por movimientos activos que se favorecen con la acción de la luz, así como por acción enzimática, desprende el opérculo del huevo y sale a nadar libremente en busca del huésped intermediario: el caracol pulmonado, al cual deberá encontrar en menos de 8 horas. Lo penetra a través de la piel del pie del caracol y dentro de este organismo, localiza el hepatopáncreas, ahí se introduce y permanece cubriendo los estadios de esporocisto y de redia.

El *esporocisto* es una estructura alargada, al momento de penetrar el caracol el *miracidio* pierde sus cilios y prácticamente lo que penetra es el *esporocisto* joven y en su interior se forman las nuevas estructuras llamadas *redias*. Las *redias* son unas estructuras longitudinales y en su interior generan nuevas estructuras llamadas *cercarias*. Las *cercarias* abandonan al caracol y nadan en el agua ayudados por su cola durante unas 8 a 12 horas, pierden su cola adoptando una forma esférica, se enquistan formando las *metacercarias*. Las *metacercarias* son las formas infectantes del huésped definitivo, generalmente se encuentran enquistadas en la vegetación acuática sumergida que normalmente comen los animales, principalmente cuando están húmedas, ya que la desecación mata fácilmente a las *metacercarias*.

Al ingresar al duodeno las *metacercarias* se desenquistan liberando al *parásito juvenil* que mediante acción enzimática y movimientos vigorosos perfora la pared intestinal, se orientan hacia el hígado y migran hasta llegar a la cápsula de Glisson, la atraviesan y llegan hasta los conductos biliares para transformarse en *adultos*; tiempo después liberan *huevos* en la luz del tránsito biliar, mismos que son arrastrados hasta el duodeno. El ciclo biológico se completa en un periodo de 3 a 4 meses.

El ciclo biológico de la *Fasciola hepatica* se esquematiza en la figura 2.1.



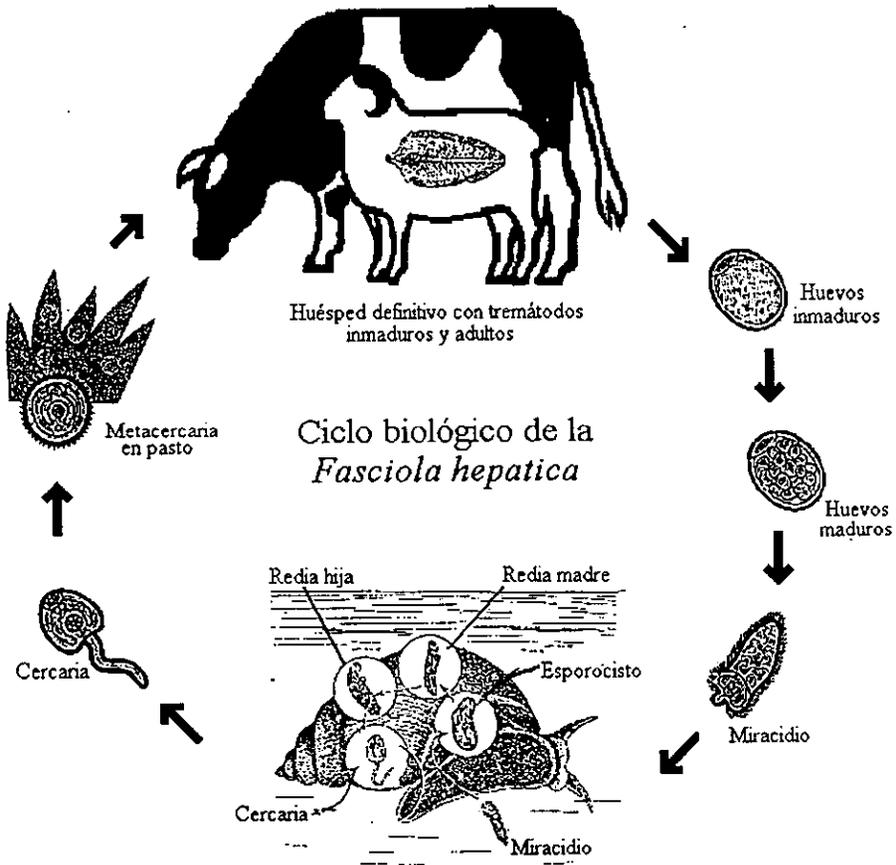


Figura 2.1
Ciclo biológico de la *Fasciola hepatica*

II.1.2 Clasificación

La fascioliasis es una enfermedad de los herbívoros. La especie doméstica más susceptible es la ovina, y en segundo término la bovina. Se presenta en forma *aguda*, *subaguda* y *crónica*¹⁰.

En la *fase aguda* de la fascioliasis, el parénquima hepático se ve invadido por una gran cantidad de *fasciolas jóvenes*, desarrollándose en forma rápida una anemia aguda con



valores de hematócrito entre el 7 y 10% del valor normal, lo cual trae como consecuencia muertes repentinas sin la aparición de signos clínicos, ni de la presencia de huevos en las heces. Estos animales se ven inquietos, nerviosos y aprensivos permaneciendo mucho tiempo echados. El curso de la enfermedad es corto y la mayoría de los animales afectados mueren en uno o dos días.

En la *Fascioliasis subaguda*, los animales antes de que aparezcan otros signos clínicos pierden peso, presentan letargo y no son capaces de seguir al resto del rebaño. Posteriormente se observa palidez de mucosas, dolor abdominal a la palpación, edema submandibular y ascitis en un pequeño número de animales. La anemia se desarrolla gradualmente y es del tipo hemorrágico, que termina por ser macrocítica hipocrómica con una marcada reticulocitosis con valores del 4 al 20%, esta reticulocitosis se presenta en animales con un hematocrito menor al 25%. Los animales generalmente sobreviven una o dos semanas después de los signos clínicos, en ellos algunas *fasciolas* ya se encuentran en estado adulto, por lo tanto los huevos del tremátodo aparecen en las heces.

En la *Fascioliasis crónica* los signos clínicos son provocados por los tremátodos en los conductos biliares, se inicia con la pérdida de peso que se presenta varias semanas después de la infestación y es acompañada de una anemia hemorrágica crónica. Los afectados se encuentran caqueticos, presentan palidez de las mucosas con edema submandibular y ascitis, anemia macrocítica e hipocrómica con un rango de 4 a 20% de reticulocitosis y hematocrito del 11 al 19%, eosinofilia al principio de la infestación, pelo quebradizo y seco, sin presentación manifiesta de hepatomegalia y sin dolor a la palpación o a la percusión. Como la mayoría de las *fasciolas* se encuentran en estado adulto, el número de huevos por gramo de heces es superior a 10 mil. Los animales afectados pueden sobrevivir varias semanas.

La brotes de Fascioliasis aguda se presentan al final del otoño y al principio de la primavera, más frecuentemente durante los meses de septiembre, octubre, noviembre y en animales que se exponen por primera vez a la fascioliasis; esto debido a la gran ingestión de metacercarias que abundan en el pasto en los meses de agosto y septiembre. La fascioliasis subaguda se presenta al final del otoño o al principio del invierno, los signos clínicos en los ovinos aparecen de noviembre a enero. De esta forma los animales ingieren gran cantidad de metacercarias por un período largo sin llegar a un número suficiente para producir una fascioliasis aguda. La fascioliasis crónica se presenta de enero a marzo. En este período del año la mayoría de las *fasciolas* ya son adultas.

II.1.3 Diagnóstico

Durante la fase aguda de la fascioliasis no es posible efectuar el diagnóstico de laboratorio por el examen coprológico, ya que no hay eliminación de huevos. En humanos esta fase debe distinguirse de la hepatitis aguda y debe sospecharse que se trata de fascioliasis por los antecedentes epidemiológicos y la presencia de eosinofilia. En



animales el diagnóstico se basa en la necropsia, mediante la observación de lesiones hepáticas y la presencia de parásitos inmaduros.

El diagnóstico de la fascioliasis crónica se realiza por medio del examen coprológico y la observación de los huevos del parásito. El método más apropiado es el de sedimentación.

Para el diagnóstico de la infección en el período prepatente (período de ingestión de la metacercaria hasta el desarrollo de la forma adulta) no se podrán observar los parásitos ni los huevos por encontrarse en migración y no haber alcanzado la madurez sexual; sin embargo; con ciertos datos como la eosinofilia elevada, se podría sospechar sobre este padecimiento. Algunas técnicas empleadas para detectar los huevos en la bilis se emplea el sondeo duodenal, en donde la muestra obtenida se analiza al microscopio en busca de los huevos con las características morfológicas de la *Fasciola hepatica*; otra técnica para obtener muestras de contenido duodenal es mediante la cápsula de Beal, que consiste en hacer llegar al duodeno una cápsula de gelatina sujeta por un hilo especial enrollado que se va soltando hasta que la cápsula llega al sitio deseado; el hilo tiene muchos filamentos y es poroso y absorbe contenido duodenal junto con los huevos de *Fasciola hepatica*. Después de una hora se retira el hilo y se exprime sobre un portaobjetos y se observa al microscopio.

Otras pruebas empleadas para la detección en período prepatente son las serológicas¹¹: hemaglutinación, inmunodifusión, inmunolectroforesis, contraímmunolectroforesis, inmunofluorescencia, aglutinación en látex, prueba cutánea de la fasciolina, fijación del complemento, hematoaglutinación pasiva, doble difusión en gel y la técnica de ELISA, detectando todas estas a los anticuerpos de la *Fasciola hepatica* a partir de la segunda o tercera semana después de la infección. Las pruebas pueden adolecer de sensibilidad o especificidad, siendo la más sensible la de ELISA. Las técnicas serológicas tanto en el hombre como en los animales en el período prepatente tiene la ventaja de un diagnóstico temprano que permitirá el tratamiento antes de que el daño hepático resulte demasiado avanzado.

II.1.4 Patología Clínica

La patogenicidad de la *Fasciola hepatica* dependerá principalmente del número de metacercarias ingeridas y de su infectividad, así como también de la respuesta del huésped y ésta a su vez, puede estar directamente relacionada con la especie animal. De ahí que la enfermedad pueda tener un curso agudo, subagudo o crónico. En cualquiera de los casos el órgano infectado es el hígado.

En la forma aguda hay hepatomegalia, el hígado es friable y con numerosas hemorragias, aún en el líquido peritoneal. En la forma crónica, la mayor consecuencia es la fibrosis, que puede ser de dos tipos: fibrosis y colangitis hiperplásica; asimismo, en estos casos se presenta trombosis en venas hepáticas. Por último, debido a la acción de los tremátodos



dentro del conducto biliar puede haber calcificación; con respecto a las proteínas éstas pueden ser alteradas y por lo tanto presentarse hipoproteïnemia.

La infección por el tremátodo *Fasciola hepatica* produce severos cambios fisiopatológicos, que conducirán a los animales a condiciones críticas, caracterizadas por anemia aunada a la hipoalbuminemia disproteinémica marcada, leucocitosis eosinofílica, incremento en enzimas como CPK, FAK, GGT, AST, OCT, y fructosadifosfatoaldosa, así como discalcemia, dismagnesemia, hipofosfatemia, hiponatremia y desbalance mineral a escala molecular.

Un aspecto que recientemente comenzó a investigarse en nuestro país, es el referente a la presencia de las *Fasciola hepatica* en pulmón, encontrándose nódulos en forma elipsoidal que contenían a los tremátodos así como exudado purulento, hemorragias, atelectasia y enfisema.

II.1.5 Importancia médica y económica

La ocurrencia en humanos¹¹ se ha presentado en forma esporádica o en forma de brotes y se ha registrado en numerosos países de América, Europa Africa y Asia. Las epidemias más extensas han ocurrido en Francia en los años 1956-57 afectando a cerca de 700 personas con múltiples casos agrupados en familias, observándose casos de fascioliasis en las zonas rurales prácticamente cada año hasta 1979. Además de Francia, la infección es común en Italia, Polonia e Inglaterra, en este último país con un brote de 40 personas en 1972. La frecuencia de infección humana en América Latina se ha subestimado en la bibliografía parasitológica, ya que en Cuba se habían registrado 100 casos hasta 1944, en Chile 82 hasta 1959. Además han ocurrido infecciones humanas en Argentina, Uruguay, Perú, Venezuela, Costa Rica (42 casos en 1978), Puerto Rico, República Dominicana y en México.

La infección humana es muchas veces subclínica o de sintomatología muy leve. En un área endémica de la Sierra Central del Perú se efectuó un estudio sobre este problema. Durante 1968 y 1969, se realizaron en 14 comunidades de la provincia de Jauja, 1557 exámenes coprológicos en escolares de 7 a 14 años, y se hallaron huevos del tremátodo en 15.6% de los examinados. En la zona de Atlixco, Puebla se encontró fascioliasis en 0.6% de la población. En Corozal, Puerto Rico de 110 individuos examinados en 12 se encontraron huevos de *Fasciola hepatica* en las heces.

La fascioliasis animal presenta variación en las tasas de mortalidad de una región a otra. En las zonas endémicas no es raro encontrar tasas superiores al 50%. Las pérdidas ocasionadas por la fascioliasis hepática, como las debidas a otras enfermedades crónicas son difíciles de calcular. Según una estimación, la eficiencia productiva de los bovinos con infecciones leves mermaría el 8% y en infecciones graves en más del 20%. en ovinos la pérdida en la producción de lana podría variar entre 20 y 39%.



La fascioliasis provoca importantes pérdidas económicas en muchas partes del mundo. Estas pérdidas generalmente se clasifican en dos grandes grupos, las pérdidas directas y las pérdidas indirectas. Las primeras se relacionan con la muerte de los animales a consecuencia de la migración de las fases juveniles del parásito a través del parénquima hepático por infestaciones en gran escala; este tipo de pérdidas es común en ovinos, sobre todo en los años en las que las lluvias alcanzan altos índices. Las pérdidas indirectas se derivan de la acción menos severa del parásito adulto alojado en los conductos biliares presentando la forma crónica de la enfermedad. Al finalizar ambos tipos de pérdidas, es fácil determinar que las segundas ocasionan sangrías más severas a la industria pecuaria, ya que son más frecuentes, sin embargo son menos notorias y generalmente no se les da la importancia que realmente tienen. La distribución de las pérdidas se clasifica en:

1. Pérdidas por decomiso parcial o total del hígado de rastros. La forma adulta del parásito al alojarse en el hígado causa lesiones y puede ser considerado no apto para el consumo humano. La pérdida es parcial cuando sólo una de sus partes está afectada y debe ser retirada, y es total cuando éste se encuentra severamente dañado.
2. Pérdidas por baja producción y mala calidad de leche. La *fasciola* causa severas lesiones al parénquima hepático, y dada la importancia que tiene este órgano en los procesos metabólicos, encargado de la producción de proteínas y grasa de la leche, es obvio que la infestación con este parásito interfiera tanto en la cantidad como en la calidad de la leche producida.
3. Pérdidas por bajas tasas de crecimiento y mala conversión alimenticia. Los animales infestados con *fasciola* sufren de inhibición en los índices de conversión alimenticia y como consecuencia en las ganancias de peso. Esto debido a la irritación en la pared intestinal originada por las *fasciolas* en las fases juveniles durante su migración al hígado, interfiriendo con la completa absorción de los alimentos, o bien con el daño que producen al hígado, afectando el metabolismo de los nutrimentos.
4. Pérdidas por baja producción y mala calidad de lana. Se ha encontrado que hay una relación inversa entre el grado de infestación y la producción y calidad de la lana.
5. Pérdidas por trastornos reproductivos. Estas pérdidas pueden ser debidas a malos índices de concepción, abortos, mortinatos y animales que nacen ya infestados, con las consecuencias que esto acarrea.
6. Pérdidas anuales totales. En este punto se agrupan las pérdidas ocasionadas por la *Fasciola hepatica* en la producción pecuaria y que se han logrado calcular a lo largo de un año por los conceptos mencionados en los puntos 1 al 5.



II.1.6 Control y tratamiento

El control de la fascioliasis humana se lleva a cabo mediante la abstención del consumo del berro silvestre o plantas acuáticas, evitar el empleo de excremento de ovinos, bovinos o el empleo de las aguas residuales como abono¹¹. Esta recomendación es en especial válida para zonas endémicas. El tratamiento ideal en humanos es el que se usa en la amebiasis intestinal aguda, el cual es la dehidroemetina a una dosis de 1 mg/Kg por día durante 10 días.

El control de la infección animal se puede realizar en cualquier estadio del desarrollo del parásito o bien reduciendo el número de hospederos intermediarios. Dado que el tratamiento del huevo, miracidio, cercaria y metacercaria, no tiene sentido por el corto tiempo de algunas de estas fases (miracidio y cercaria) o por ser poco práctico (huevo y metacercaria), solo se emplean los molusquicidas y fasciolicidas¹⁰.

Los molusquicidas se emplean para eliminar los moluscos, y los más empleados son las sales minerales, complejos de coordinación con metales pesados y productos orgánicos alifáticos y aromáticos de cadena corta o larga. Los fasciolicidas son compuestos que matan a las diferentes especies de *fasciolas*, son administrados directamente a los mamíferos y pueden tener efecto contra formas adultas, juveniles o ambas.

Antes de 1938, no existían fármacos útiles para el tratamiento de las fascioliasis¹². El arsénico y varios productos naturales como la nicotina y el aceite de chenopodium presentaban una actividad limitada. El descubrimiento de la actividad antihelmíntica de la fenotiazina hizo disponible un compuesto de espectro moderado, a la vez no muy potente y virtualmente tóxico. Los bencimidazoles reportados en 1961, seguidos por el éxito comercial del tiabendazol, señalaron una nueva era de fármacos de amplio espectro, seguridad y efectividad oral. Estudios de estructura-actividad lograron encontrar otros bencimidazoles más potentes con actividad expandida a los parásitos intestinales y trematodos del hígado (ver tabla 2.1). La ventaja del tetramisol (1965) seguido por el l-levamisol proporcionó una relativa seguridad oral y parenteral lo cual explica su uso extenso, especialmente en ganado vacuno. El pirantel y el morantel fueron desarrollados en el mismo período y han sido empleados con cierto éxito en el tratamiento de infecciones. En 1976 se descubrió la ivermectina como un agente parasitario de amplio espectro. La ivermectina es muy potente e igualmente efectiva por vía oral y parenteral, también es efectiva en el tratamiento de ectoparasitos. La eficiencia de los diferentes compuestos empleados en el tratamiento de la fascioliasis se resume en la tabla 2.2.

La búsqueda de mejores fármacos guiados por estudios de mecanismo de acción y de bioquímica comparativa continuó en muchas instituciones de investigación¹². Entre los bencimidazoles más efectivos en el tratamiento de la fascioliasis, se encuentra el



albendazol un análogo en la serie de los bencimidazoles, el cual presenta un espectro antihelmíntico que incluye al menos a la *Fasciola hepatica* en estado de madurez aunque requiere de altas dosis para ejercer su actividad. En épocas recientes se ha empleado el triclabendazol que ha sido bien tolerado, con un amplio margen de seguridad y muy eficaz contra las *fasciolas* tanto maduras como inmaduras. Este compuesto presenta una mayor biodisponibilidad que los bencimidazolcarbamatos, y difiere en su estructura por presentar un grupo metiltio en posición 2 en lugar del grupo metilcarbamato. El triclabendazol ha demostrado ser efectivo en ovinos⁶ y bovinos¹³ con resultados altamente satisfactorios.

Los antihelmínticos para el tratamiento de infecciones gastrointestinales pueden ser administrados parenteralmente, oralmente o por inyección intraruminal. Se han empleado una amplia variedad de formulaciones, incluyendo tabletas, líquidos, pastas, gránulos y polvos para la inclusión en alimentos o agua. También se ha considerado importante contar con formulaciones de liberación prolongada para proveer control profiláctico durante largo tiempo, pero únicamente el morantel esta disponible comercialmente en forma de bolo intraruminal.

La administración parenteral por inyección, o la administración oral en forma de tableta, líquido o pasta son vías adecuadas para su administración.



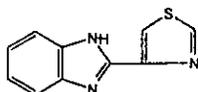
Tabla 2.1
Diversos benzimidazoles desarrollados para el tratamiento de la *Fasciola hepatica*

TIABENDAZOL

$C_{10}H_7N_3S$

P.M. = 201.26

2-(4-tiazolil)-1H-benzimidazol



Sinónimos: MK-360; Omnizol; Thiaben; Bovizol; Eprofil; Equizol; Mintezol; Top Form Wormer; Mertect, Lombristop, Minzolom, Nemapan, Polival, TBZ, Tecto.

Cristales con punto de fusión 304-305°C

UV max (metanol): 298 nm ($\epsilon = 23\ 330$). Fluorescencia en solución ácida: 370 nm (310 nm excitación)

Solubilidad: máxima solubilidad en agua a pH 2.2: 3.84%; soluble en dimetilformamida; ligeramente soluble en alcoholes, ésteres, hidrocarburos clorinados.

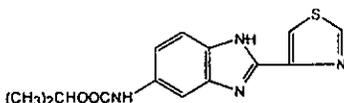
Toxicidad: DL₅₀ oralmente en ratones, ratas y conejos: 3.6, 3.1, > 3.8 mg/Kg

CAMBENDAZOL

$C_{14}H_{14}N_4O_2S$

P.M. = 302.35

5-isopropoxycarbonilamino-2-(4-tiazolil) benzimidazol



Sinónimos: MK-905; Bonlam; Bovicam; Cambenzol; Cambet; Equiben; Novazol; Noviben.

sólidos blancos cristalinos, olor característico, punto de fusión 238-240°C.

UV max en solución HCl 0.1 N: 319, 232 nm. (740,760)

Estable en soluciones ácidas y básicas dentro del rango de pH de 1-12

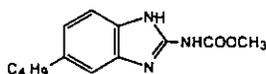
Solubilidad: soluble en alcohol y dimetilformamida; ligeramente soluble en acetona; poco soluble en benceno; muy poco soluble en HCl 0.1 M; prácticamente insoluble en isotano y agua (0.02 mg/mL).

PARBENDAZOL

$C_{13}H_{17}N_3O_2$

P.M. = 247.29

5-butil-2-benzimidazolcarbamato de metilo.



Sinónimos: SKF 29044; Helmatac; Verminum, Worm Guard

Cristales en solución acuosa de etanol, punto de fusión 225-227°C;

UV max (95% etanol/litro HCl 1 N): 282, 288 nm ($\epsilon = 16200, 20000$).

Solubilidad: prácticamente insoluble en agua.

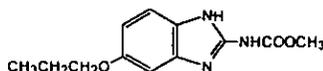
Toxicidad: DL₅₀ via oral ratones y ratas > 4 g/Kg

OXIBENDAZOL

$C_{12}H_{15}N_3O_3$

P.M. = 249.27

5-propoxi-2-benzimidazolcarbamato de metilo.



Sinónimos: SKF 30310; Antelcid EQ; Equitac.

Cristales: punto de fusión 230-230.5°C.

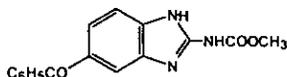


MEBENDAZOL

$C_{16}H_{13}N_3O_3$

P.M. = 295.35

5-benzoil-2-bencimidazolcarbamato de metilo.



Cristales en ácido acético y metanol, punto de fusión: 288.5°C.

Toxicidad: DL₅₀ por vía oral > 80 mg/Kg en borregos; >40 mg/Kg en ratones, ratas y pollos.

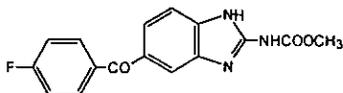
Sinónimos: R 17635; Ovitelmin; Pantelmin; Telmin; Vermirax; Vermox.

FLUBENDAZOL

$C_{16}H_{12}FN_3O_3$

P.M. = 313.30

5-(p-fluorobenzoil)-2-bencimidazolcarbamato de metilo.



Cristales: punto de fusión 260°C.

Toxicidad: DL₅₀ en ratones, ratas y cerdos guineas: > 2560 mg/Kg por vía oral.

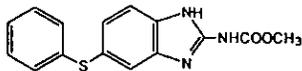
Sinónimos: R 17889; Flumoxal; Flumoxano; Flubenol; Flutelmin.

FENBENDAZOL

$C_{15}H_{13}N_3O_2S$

P.M. = 299.35

5-feniltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo.



Polvo cristalino ligeramente café – grisáceo, olor característico, punto de fusión 233 °C

Solubilidad: insoluble en agua, muy soluble en dimetilsulfóxido.

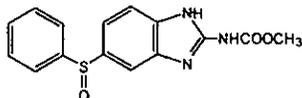
Sinónimos: HOE 881 v; Panacur.

OXFENDAZOL

$C_{15}H_{13}N_3O_3S$

P.M. = 315.35

5-fenil-sulfinil-2-bencimidazolcarbamato de metilo.



Cristales en cloroformo - metanol punto de fusión 253°C.

Toxicidad: DL₅₀ en perros, ratas y ratones: > 1600, >6400, >6400 mg/Kg

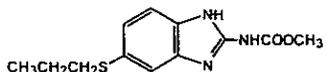
sinónimo: RS 8858; Sinantic; Sistamex

ALBENDAZOL

$C_{12}H_{15}N_3O_2S$

P.M. = 265.33

5-propiltio-2-bencimidazolcarbamato de metilo.

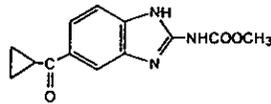


Cristales coloridos, punto de fusión 208 – 210°C

Sinónimos: SKF 62279, Valbazen, Zentel.



CICLOBENDAZOL



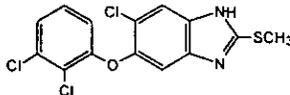
Cristales en ácido acético, punto de fusión 250.5°C

C₁₃H₁₃N₃O₃
P.M. = 259.25

5-(ciclopropilcarbonyl)- 2-bencimidazolcarbamato de metilo.

Sinónimos: CC-2481; R-17147; Haptocil

TRICLABENDAZOL



Cristales blancos, punto de fusión 175°C

C₁₄H₉Cl₃N₂OS
P.M. = 501.80

5-Cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-(metiltio)-1H-bencimidazol

Solubilidad: soluble en 0.01 ppm en agua soluble en metanol.²¹

Toxicidad: DL₅₀ en ratones y ratas vía oral > 8000 mg/Kg, vía dérmica > 8000 mg/Kg, en conejos vía oral 206 mg/Kg, DL₅₀ para el sulfóxido y sulfona de triclabendazol en ratas > 5000 mg/Kg

Sinónimos: CGA 89317, Fasinx

Tabla 2.2

Espectro de efectividad de diferentes fármacos a dosis recomendadas contra *Fasciola hepatica* en borregos

Fármaco	Tiempo de postinfección (en semanas)													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CCl ₄ , Bromsalans, Hexacloroetano, Hexaclorofeno, Bromofenofos, Oxiclosanida, Niclofolan, Albendazol.										50-90 %				91-99 %
Nitroxinil, Closantel								50-90 %						91-99 %
Rafoxanida, Clorsulon					50-90 %									91-99 %
Triclabendazol			90-99 %											99-100 %
Diamfenetida				91-100 %										50-90 %



II.1.7 Mecanismo de acción de los bencimidazoles

Existen tres hipótesis acerca del mecanismo de acción de los bencimidazoles¹³⁻¹⁴:

(1) inhibición del fumarato reductasa, (2) inhibición del transporte de glucosa, (3) interrupción de la función microtubular. La mayoría de los trabajos recientes sugieren que la categoría 3 representa el mecanismo primario de acción.

1. Fumarato reductasa

Al adicionar una solución 10^{-3} M de tiabendazol (TBZ) en homogenados de *H. contortus* se encontró una completa inhibición de la oxidación de NADH en la presencia de fumarato. Así mismo se observó que alrededor del 85 % de la oxidación de NADH en la presencia de fumarato es inhibida por 10^{-3} M de TBZ en homogenados de una cadena susceptible de *H. contortus*¹³.

2. Transporte de glucosa

Al adicionar una solución de 10^{-5} M o 10^{-6} M de mebendazol (MBZ), a *Ascaris sumi* y larvas de *Trichinella spiralis*, se observó una inhibición en el transporte de glucosa dando lugar a una reducción de las reservas de glucógeno. Sin embargo, otros estudios indican que inhiben el transporte de glucosa, siendo específica entre bencimidazoles solo para mebendazol¹³.

3. Microtúbulos

Los microtubulos son los componentes estructurales mayoritarios de las células eucarióticas y estan constituidas de polipéptidos de α -tubulina y β -tubulina. En la mayoría de los metazoarios los genes β -tubulina consisten de copias de genes dispersados a través del genoma. La secuencia β -tubulina se conservan en todas las células eucarióticas presentando una mayor diferencia en el grupo carboxi terminal. Aunque se ha observado una homología muy cercana entre las estructuras β -tubulinas de los tremátodos y de los mamíferos, ambos presentan diferencias en su respuesta a los inhibidores de la tubulina, en los tremátodos la unión de los bencimidazoles a la β -tubulina es mayor que en los mamíferos¹⁴. Le Jambre demostró en 1988 que los bencimidazoles unidos a la tubulina de los tremátodos altera el equilibrio tubulina-microtúbulo y causa despolimerización de los microtúbulos¹⁴.

Otros estudios sugieren que dada la estructura general de los bencimidazoles éstos probablemente intervengan con las reacciones que involucran a los grupos purina. Cuando los bencimidazoles interactúan con las enzimas metabólicas en parásitos, el efecto letal de los fármacos es debido a que las concentraciones disponibles de ATP para el parásito disminuyen, viéndose comprometida su sobrevivencia dentro del huésped.



II.2 Triclabendazol como agente fasciolicida

Los agentes fasciolicidas son escasos, algunos de ellos presentan reducido espectro de acción, baja seguridad, alto costo y sistemas de dosificación poco funcionales. Los fasciolicidas más destacados en México son el triclabendazol (*Fasinex*, Novartis), y otros fasciolicidas no relacionados estructuralmente, tales como el closantel (*Flukiver*, Janssen Pharmaceutica), rafoxanide (*Ranide*, Merck Sharp and Dhome), clorsulon (*Ivomec-f*, Merck Sharp and Dhome) nitroxinil (*Trodax*, Rone Mériex), netobimin (*Hapadex*, *Sheramex*), todos ellos de importación, razón por la cual la fuga de divisas al igual que los costos del tratamiento se ven incrementados.

El triclabendazol presenta una actividad del 99-100% contra todos los estadios de la *Fasciola spp.* La dosis usualmente empleada para la eliminación de la *Fasciola hepatica* en sus formas maduras e inmaduras es de 5-10 mg/Kg en borregos y cabras, y 12 mg/Kg en ganado vacuno^{6,15-16}. El triclabendazol también se ha utilizado con éxito para el tratamiento de la fascioliasis humana¹⁷⁻¹⁸ con una dosis oral única de 10-12 mg/Kg.

A pesar que el triclabendazol tiene poco tiempo de haber sido introducido al mercado mundial⁴, existen informes de estudios de farmacocinética en diferentes especies animales, encontrándose que después de la administración oral, el triclabendazol es biotransformado siendo el sulfóxido y la sulfona los dos metabolitos principales. Más del 95% de la cantidad administrada por vía oral es eliminada en las heces, aproximadamente el 2% en la orina y menos del 1% en la leche⁴.

Después de una administración oral dos de los metabolitos del triclabendazol: el sulfóxido y la sulfona se han encontrado en mayor proporción en la sangre y en la leche. Kinabo y Bogan²⁷, encontraron que al tercer día el sulfóxido presentaba una relación 1/150 en plasma/leche; sin embargo, la sulfona al sexto día tan solo presentaba una relación 1/20.

Un estudio realizado utilizando el fármaco marcado en borregos y cabras mostró que después de una dosis oral de 10 mg/Kg se encontraron concentraciones máximas en sangre de aproximadamente el equivalente a 15 ppm de triclabendazol entre las 24 y 36 horas disminuyendo a 0.1 ppm a los 10 días. La eliminación presenta cinética de primer orden con una vida media de 22-24 horas. En cabras las concentraciones máximas en leche se encontraron entre las 8 y 24 horas a 1.79 ppm disminuyendo a 0.12 ppm a los 10 días.

A los 10 días se encontraron residuos en los tejidos de los ovinos y los bovinos entre 2.4 y 3% de la dosis marcada. Después de una dosis oral de 10 mg/Kg en ovinos y de 12 mg/Kg en bovinos los residuos del triclabendazol y sus metabolitos son detectables en músculo, hígado y riñón hasta 28 días después y en grasas hasta por 8 días (límite de



determinación: 0.03 mg/Kg). Los valores encontrados en borregos al día 28 y en bovinos al día 14 están por debajo de 0.4 mg/Kg tanto en músculo como en los demás tejidos comestibles. Basados en los estudios de toxicidad sub-crónica disponibles, estas concentraciones están consideradas como aceptables para el consumo humano con periodos de cuarentena de 14 y 28 días para bovinos y ovinos respectivamente¹⁹.

Considerando que los bencimidazoles presentan metabolismo oxidativo en el hígado y que la *Fasciola hepatica* se hospeda en este mismo órgano, algunos estudios se han enfocado a determinar como se ven afectados los parámetros farmacocinéticos bajo tales condiciones. Kinabo, et. al.²⁷ no encontraron diferencias en cabras infectadas y no infectadas. Sanyal y colaboradores³⁰ administraron diferentes dosis de triclabendazol en grupos de búfalos con 2 y 10 semanas de infección con *F. hepatica*, cuantificaron los huevos de *fasciola* en heces y los parásitos en los hígados posterior al estudio de farmacocinética, resultando que la dosis más adecuada es de 24 mg/Kg para los parásitos maduros e inmaduros, debido principalmente a que la actividad enzimática del hígado se ve reducida por la presencia del parásito.

Se han reportado diferencias en los parámetros farmacocinéticos entre bovinos, ovinos, caprinos y equinos, atribuibles básicamente a disimilitudes anatómicas²⁰.

El triclabendazol, a diferencia de los otros bencimidazoles, presenta una extensa unión a proteínas, Mohammed y col.²¹ reportan una unión mayor al 99% a concentraciones de 6, 9, 12, 22 y 30 µg/mL. Hennessy y col.²² por otro lado, encontraron que se une a la albúmina y es lentamente liberado del hígado, la unión no es covalente por que los metabolitos pueden ser fácilmente disociados por disolventes orgánicos como la acetona²³.

La eficiencia y el espectro de actividad de los bencimidazoles está determinada principalmente por el tiempo que los parásitos están expuestos al fármaco²⁴, Hennessy propuso que la concentración mínima tóxica para los parásitos es la mitad de la concentración máxima, obtenida después de la administración de una dosis terapéutica y para óptimos resultados esta debe ser mantenida el mayor tiempo posible²⁰.

En las tablas 2.3 y 2.4 se resumen los parámetros farmacocinéticos de los metabolitos del triclabendazol en diferentes especies animales.

Existen reportes en la literatura indicando que los bencimidazoles presentan un mecanismo de acción similar³¹ y que las diferencias en su eficacia contra diferentes grupos de parásitos, se deben probablemente a diferencias en su biodisponibilidad. Los antihelmínticos más potentes de este grupo son los que presentan velocidades de absorción y de eliminación lentas²⁴. Así mismo las diferencias en la eficacia se han atribuido: *in vivo* a las diferencias en la farmacocinética en los huéspedes e *in vitro* a la solubilidad acuosa y por consiguiente a su absorción en el medio de cultivo. Así por



ejemplo, en ruminantes fármacos como el tiabendazol y el cambendazol que son altamente solubles en el rumen, tienden a ser bien absorbidos y tienen una vida media de eliminación más corta, que los bencimidazoles menos solubles. Los fármacos menos solubles permanecen en el plasma por períodos más prolongados, y asumiendo que existe un equilibrio entre el plasma y el tracto gastrointestinal, el período de tiempo durante el cual el parásito se encuentra expuesto a concentraciones efectivas se ve incrementado. Sin embargo, en el caso extremo de fármacos con muy baja solubilidad, estos son menos efectivos por presentar una baja absorción y por lo tanto son excretados inalterados en las heces, como lo es el caso del oxfendazol cuyos valores de solubilidad son de 0.006, 0.003 y 0.044 mg/mL a pH de 7.4, 6.0 y 2.2. La solubilidad no es el único parámetro que afecta la biodisponibilidad y los bencimidazoles pueden ser extensamente metabolizados y excretados en el tracto gastrointestinal, presentando por lo tanto bajas concentraciones en plasma, este es el caso del parbendazol que tiene baja solubilidad, siendo además extensamente metabolizado en el rumen por lo que presenta bajas concentraciones en plasma ($< 0.08 \mu\text{g/mL}$).



Tabla 2.3
Parámetros farmacocinéticos del sulfóxido de triclabendazol en diferentes especies animales

Especie animal	Dosis mg/Kg	Parámetros farmacocinéticos						ref.
		ABC $\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$	C_{max} $\mu\text{g}/\text{mL}$	t_{max} h	k_e h^{-1}	$t_{1/2c}$ h		
Borregos	a	763 \pm 91	13.1 \pm 1.4	34.0 \pm 1.8	-----	16.0 \pm 1.7	21	
	b	783 \pm 95	11.3 \pm 1.1	27.0 \pm 4.4	-----	19.8 \pm 2.4		
	a	756.5 \pm 183.1	14.6 \pm 4.1	21.2 \pm 7.5	-----	19.5 \pm 3.5		
Bovinos	12 a	704.5 \pm 5.58	9.64 \pm 1.43	40.28 \pm 2.11	-----	29.19 \pm 1.44	26	
	24 a	1936.90 \pm 48.88	18.61 \pm 2.05	41.97 \pm 2.33	-----	34.05 \pm 2.27		
Cabras	12 a,c	606 \pm 79	14.88 \pm 2.07	12.80 \pm 1.49	0.0311 \pm 0.0009	22.38 \pm 0.66	27	
	a,d	450 \pm 55	12.99 \pm 1.24	17.60 \pm 2.99	0.0315 \pm 0.0037	25.53 \pm 3.23		
Caballos	12 a	115 \pm 25	4.57 \pm 1.11	8	0.0710 \pm 0.0054	9.74		
Ponies	12 a	157 \pm 20	4.01 \pm 0.25	26.67 \pm 2.67	0.0635 \pm 0.0051	10.91	28	
Burros	12 a	100 \pm 16	4.34 \pm 0.86	9.33 \pm 1.33	0.0735 \pm 0.0047	9.40		
	12 a	41.93 \pm 4.36	0.66 \pm 0.21	20.56 \pm 2.66	-----	29.74 \pm 3.41	26	
	24 a	156.56 \pm 52.10	2.84 \pm 1.98	20.85 \pm 1.88	-----	20.35 \pm 1.71		
Búfalos	24 a	182.92 \pm 2.69	5.50 \pm 0.16	23.91 \pm 1.22	-----	16.49 \pm 0.68	29	
	a,e	76.27 \pm 7.31	1.48 \pm 0.09	23.80 \pm 0.81	-----	24.13 \pm 1.91		
	a,f	75.19 \pm 6.39	1.75 \pm 0.11	24.00 \pm 0.57	-----	31.68 \pm 1.57		
Búfalos	24 a,e	184.75 \pm 5.81	5.50 \pm 0.19	23.54 \pm 0.68	-----	17.76 \pm 4.86	30	
	a,f	304.21 \pm 6.02	5.70 \pm 0.08	25.12 \pm 2.02	-----	31.47 \pm 3.91		
Camellos	36 a,e	257.39 \pm 5.82	6.27 \pm 0.10	24.27 \pm 0.58	-----	19.04 \pm 1.29	25	
	a,f	350.10 \pm 6.02	7.27 \pm 0.15	24.00 \pm 0.71	-----	20.13 \pm 1.75		
Camellos	10 a	294.8 \pm 119.9	4.54 \pm 2.17	20.7 \pm 2.7	-----	30.1 \pm 5.2	25	

a. Administración del triclabendazol solo, b. Administración combinada con el fenbendazol (para proporcionar una actividad de amplio espectro), c. Cabras libre de parásitos, d. Cabras infectadas con *Fasciola hepatica*, e. Búfalos con 2 semanas de posinfección, f. Búfalos con 10 semanas de posinfección de *F. hepatica*.



Tabla 2.4
Parámetros farmacocinéticos de la sulfona de triclabendazol en diferentes especies animales

Especie animal	Dosis mg/Kg	Parámetros farmacocinéticos						ref.
		ABC µg*h/mL	C _{max} µg/mL	t _{max} h	ke h ⁻¹	t _{1/2ε} h		
Borregos	a	885 ± 63	13.7 ± 1.0	42.0 ± 2.4	-----	-----	25.4 ± 1.0	21
	b	859 ± 43	11.1 ± 0.9	50.0 ± 4.4	-----	-----	29.1 ± 1.2	
	a	812.9 ± 152.3	12.1 ± 0.29	30.1 ± 7.3	-----	-----	17.8 ± 3.8	
Bovinos	12	4664.25 ± 15.16	15.57 ± 0.55	119.62 ± 7.60	-----	-----	134.66 ± 4.02	26
	24	5178.70 ± 15.50	23.98 ± 2.32	93.56 ± 5.03	-----	-----	83.93 ± 2.23	
Cabras	12	730 ± 99	12.37 ± 1.20	25.60 ± 1.94	0.0363 ± 0.0021	-----	19.36 ± 1.11	27
	a,d	699 ± 114	12.11 ± 2.16	34.80 ± 5.49	0.0329 ± 0.0037	-----	21.80 ± 2.29	
Caballos	12	594 ± 97	13.15 ± 1.56	25.33 ± 6.67	0.0393 ± 0.0047	-----	17.65	
Ponies	12	710 ± 81	13.00 ± 2.50	29.33 ± 2.67	0.0300 ± 0.0007	-----	23.08	28
Burros	12	63 ± 6	2.94 ± 0.44	12	0.0766 ± 0.0158	-----	9.06	
	12	19.50 ± 6.72	0.26 ± 0.11	27.68 ± 4.85	-----	-----	27.77 ± 5.48	26
Búfalos	24	126.17 ± 58.96	1.84 ± 0.82	26.87 ± 1.22	-----	-----	21.71 ± 1.87	29
	24	154.37 ± 3.19	3.94 ± 0.11	24.12 ± 1.37	-----	-----	18.36 ± 1.01	
	12	140.59 ± 2.42	2.31 ± 0.22	29.62 ± 2.83	-----	-----	25.90 ± 1.92	
Búfalos	a,f	149.28 ± 2.24	3.18 ± 0.09	28.96 ± 3.16	-----	-----	26.33 ± 1.05	30
	a,e	336.05 ± 1.82	7.44 ± 0.46	30.01 ± 1.82	-----	-----	18.76 ± 1.99	
Búfalos	a,f	459.09 ± 7.33	6.95 ± 0.17	29.13 ± 1.02	-----	-----	34.64 ± 2.01	30
	a,e	481.90 ± 6.89	8.54 ± 0.20	28.19 ± 1.33	-----	-----	22.39 ± 1.01	
Camellos	a,f	689.02 ± 5.35	10.37 ± 0.19	30.00 ± 1.01	-----	-----	25.39 ± 0.98	25
	a	152.7 ± 93.27	2.40 ± 1.48	25.1 ± 3.69	-----	-----	20.9 ± 6.66	

a. Administración del triclabendazol solo, b. Administración combinada con el fenbendazol (para proporcionar una actividad de amplio espectro), c. Cabras libre de parásitos, d. Cabras infectadas con *Fasciola hepatica*, e. Búfalos con 2 semanas de posinfección, f. Búfalos con 10 semanas de posinfección de *F. hepatica*.



II.3 α BIOF10 como agente fasciolicida

Dado que los estudios de relación estructura química - actividad farmacológica muestran que se requiere un anillo benzimidazólico, y el grupo metiltio en posición 2 para la actividad fasciolicida, los sustituyentes en posición 5 y 6 son importantes pero no esenciales, por lo tanto estas posiciones podrían ser sustituido por otros grupos teniendo un comportamiento electrónico similar. Como parte de un programa de síntesis de nuevos compuestos antihelmínticos, y con el fin de obtener una mayor información acerca de los requerimientos estructurales para la actividad antihelmíntica, así como para ofrecer una alternativa nacional en el tratamiento de la fascioliasis, en el departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM, se sintetizó una serie de compuestos analógicos al triclabendazol, entre ellos el 6-cloro-5-(2-naftiloxi)-2-(metiltio)-1H-benzimidazol (α BIOF10). En este compuesto el grupo 1,2-diclorofenoxi del triclabendazol fue sustituido por un equivalente isostérico, el grupo 1 naftiloxi.

El α BIOF10 fue evaluado contra *Fasciola hepatica* *in vitro* e *in vivo* en el Instituto de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) plantel Cuernavaca, Morelos. Los resultados fueron los siguientes:

La actividad *in vitro* se evaluó frente a metacercarias recién desenquistadas utilizando concentraciones de 0.37, 1.1, 3.3, 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$ del compuesto α BIOF10; después de un período de 4 días de exposición se contabilizaron las metacercarias, los resultados fueron contrastados con respecto a un grupo control. Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 2.5.

Tabla 2.5
Actividad biológica *in vitro* del compuesto α BIOF10

Disminución de metacercarias de <i>Fasciola hepatica</i> (%)				
0.37 $\mu\text{g/mL}$	1.1 $\mu\text{g/mL}$	3.3 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$
0.0	0.0	77.5	100.0	100.0

La evaluación *in vivo* se realizó en dos experimentos. En la primera evaluación 27 borregos *crossbreed* fueron infectados con 150 metacercarias cada uno; 10 semanas después de la infección, los borregos fueron divididos al azar en 3 grupos de 9 animales cada uno; a los grupos 1 y 2 se les administró por vía oral el fármaco puro a dosis de 10 y 15 mg/Kg respectivamente y el grupo 3 fue el control. Dos semanas después del tratamiento, los animales fueron sacrificados y los parásitos fueron retirados del hígado y contabilizados. La eficacia se determinó como el porcentaje de duelas eliminadas en comparación con el grupo control, los resultados obtenidos se observan en la tabla 2.6.



Tabla 2.6
Actividad biológica del α BIOF10 puro en borregos

mg/Kg	Disminución de <i>Fasciola hepatica</i> (%)	
	Adultos (10 semanas)	Jóvenes (4 semanas)
10	80.6	82.2
15	86.9	87.2

En un segundo experimento se infectaron 25 borregos *crossbreed* con 200 metacercarias cada uno; 50 días después los animales fueron reinfectados con 100 metacercarias. Cuatro semanas posteriores a la reinfección, los animales fueron divididos en 5 grupos de 5 animales cada uno. Los grupos 1 al 4 fueron tratados con el compuesto α BIOF10 a una dosis de 15 mg/Kg. En esta ocasión se probaron 4 diferentes formulaciones para cada grupo, el grupo 5 fue mantenido como grupo control sin recibir formulación alguna. Los animales fueron sacrificados 15 días después del tratamiento y el porcentaje de reducción fue obtenido al contar las duelas adultas (12 semanas) y las duelas jóvenes (4 semanas) en los hígados. Los resultados de estos experimentos se presentan en la tabla 2.7.

Con base en estos resultados se puede observar que *in vitro* e *in vivo* el α BIOF10 es muy activo y es capaz de causar lisis en metacercarias. Al evaluar los ensayos *in vivo* se encontró que las formulaciones A y B presentan mayor actividad contra *fasciolas* en estado maduro e inmaduro. En términos generales se concluyó que a dosis de 15 mg/Kg el nuevo compuesto es tan efectivo como el triclabendazol presentando una respuesta de 100% tanto sobre *fasciolas* maduras (10 semanas) como en las inmaduras (4 semanas). Esta observación hace suponer que el α BIOF10 es un agente promisorio en el tratamiento de la fascioliasis, presentando mayor eficacia que la Rafoxanida, que tan sólo es activa contra las *fasciolas* adultas con 10-12 semanas o la Diamfetanida tan sólo contra *fasciolas* inmaduras (2 semanas).

Estos resultados llevan a recomendar el continuar con los estudios de Fase I para el desarrollo de nuevos medicamentos. Organismos internacionales de regulación como la FDA^{32,33} y el Japanese Ministry of Health and Welfare³⁴, solicitan para su registro estudios de farmacocinética en diferentes especies animales, en este caso se seleccionó como modelo animal al borrego por ser la especie animal que se ve afectada en mayor magnitud a nivel mundial.

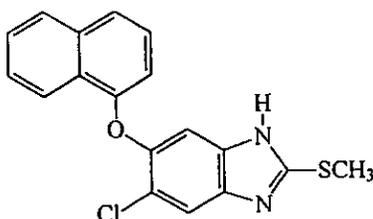


Tabla 2.7
Actividad biológica *in vivo* del α BIOF10

Grupo	Formulación	% reducción de duelas a 15 mg/Kg
4 semanas de posinfección		
1	A	100
2	B	100
3	H ₂ O	0.0
11 semanas de posinfección		
1	A	100
2	B	100
3	C	92.4
4	D	77.0
5	H ₂ O	0.0

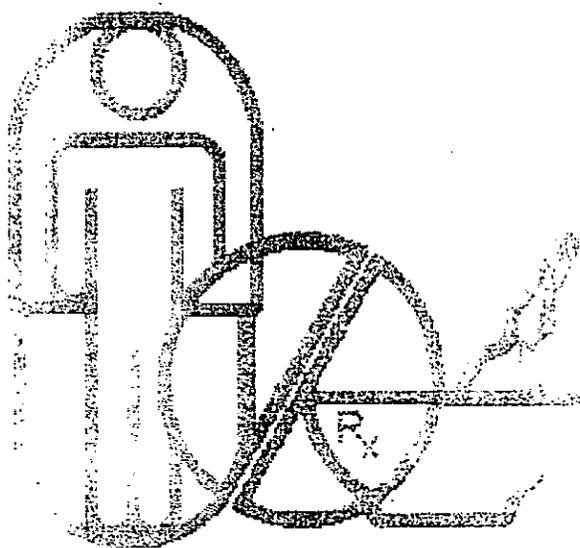
II.4 Propiedades del α BIOF10

Poco se conoce en la actualidad acerca de las propiedades del α BIOF10, se sabe que es un polvo blanco cristalino con ligero olor característico. Su fórmula condensada es C₁₈H₁₃ClN₂OS. Su fórmula desarrollada es:



Su nombre científico es el 6-cloro-5-(2-naftiloxi)-2-(metiltio)-1H-benzimidazol, tiene un peso molecular de: 340.86 g/mol y un punto de fusión de 171-179° C.





Biofarm

III.

Parte

Experimental

III.1 Determinación de las propiedades fisicoquímicas

III.1.1 pKa

Reactivos y equipo

- α BIOF10 100 % pureza, sintetizado en el laboratorio 122 del Departamento de Farmacia de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.
- Soluciones de HCl 0.01M y NaCl 0.01 M con valores de pH de 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 y 2.2
- Soluciones amortiguadoras de fosfatos 0.01 M pH de 2.4, 2.6, 3.0, 3.4, 3.8, 4.2, 4.6, 5.0, 5.4, 5.8, 6.2, 6.6 y 7.0
- Soluciones calibradoras de pH conocido marca Merck
- Potenciómetro pH/ISEmeter modelo 710A
- Balanza analítica OHAUS modelo Analytical Plus
- Agitador con termostato ENDOCAL modelo RTE-110 NESLAB
- Espectrofotómetro de Arreglo de Fotodiodos Hewlett-Packard modelo 8452A con celda de agitación y control de temperatura
- Celdas de cuarzo de 1 cm de diámetro
- Programa HP89532A General Scanning Software
- Computadora Delta 486AT

Procedimiento

La determinación del pKa se realizó de acuerdo al método reportado por Albert y Serjeant³⁵ y se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se obtuvieron los espectros de absorción de las soluciones del " α BIOF10" a pH entre 1.0 a 7.0 a 37°C, ajustando la línea base con las misma solución amortiguadora en la que se llevó a cabo las disolución. Cada determinación se realizó por triplicado.

Una vez obtenidos los espectros, se seleccionó la longitud de onda analítica y se determinaron los valores de absorbancia del α BIOF10 para posteriormente proceder a calcular el pKa.

III.1.2 Solubilidad

Reactivos y equipo

- α BIOF10 100 % pureza, sintetizado en el laboratorio 122 del Departamento de Farmacia de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.
- Filtros de 0.45 μ m tamaño de poro
- Espectrofotómetro Beckman DU68
- Balanza analítica OHAUS modelo 7125
- Soluciones amortiguadoras de fosfatos 0.1 M pH de 1.3, 2.2, 6.0, 7.4
- NaOH 0.1 N, HCl 0.1N, Propilenglicol, Acetonitrilo, acetona, hexano, metanol y dimetilsulfóxido.



Procedimiento

La solubilidad del α BIOF10 se determinó por el método de Yalkowski³⁶⁻³⁸, para esto se colocaron 10 mL del disolvente en un tubo de ensayo con tapón de rosca y se adicionó el α BIOF10 en exceso, hasta formar una solución sobresaturada. Los tubos se sellaron y sometieron a agitación a 37°C por 24 horas. La solución en equilibrio se filtró a través de un filtro de 0.45 μ m. La primera porción del filtrado se descartó para asegurar la saturación del filtro y la porción remanente del filtrado se utilizó para su cuantificación por espectrofotometría realizando el estudio por triplicado. Se prepararon curvas de calibración en cada uno de los disolventes y se interpolaron las absorbancias para determinar las concentraciones del α BIOF10.

III.1.3 Coeficiente de partición

Reactivos y equipo

- α BIOF10 100 % pureza, sintetizado en el laboratorio 122 del Departamento de Farmacia de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química. UNAM.
- Octanol R. A. Baker lote C24J8356
- Balanza analítica OHAUS modelo 7125
- Espectrofotómetro Beckman DU68
- Centrifuga Eppendorff modelo 5416

Procedimiento

La determinación del coeficiente de partición se realizó empleando la técnica de Yalkowski y Nielsen^{37,39}, se preparó una solución de α BIOF10 en octanol a una concentración de 0.1 mM, a partir de la cual se obtuvo una curva de calibración con las siguientes concentraciones 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mM. La longitud de onda de máxima absorción para el α BIOF10 en octanol se determinó a partir de la solución 0.04 mM, la cual fue de 300 nm.

Primeramente se saturó la fase acuosa, la cual se preparó agitando un exceso de octanol con el agua por espacio de 1 hora. Una vez en el equilibrio, la fase acuosa se separó de la orgánica, y esta última se desechó. Posteriormente se preparó una disolución de α BIOF10 en octanol a una concentración de 0.04 mM, y se le adicionó el agua saturada en octanol. La mezcla se agitó durante una hora y se separó por gravedad, después se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 15 min.

La cuantificación del α BIOF10 se realizó interpolando la respuesta en absorbancia en la curva de calibración. Los datos experimentales se aplicaron en la siguiente ecuación:

$$P = \left(\frac{C_i - C_w}{C_w} \right) \left(\frac{V_w}{V_o} \right)$$

de donde C_i y C_w representan la concentración del soluto en la fase orgánica antes y después de la distribución; respectivamente, V_w representa el volumen de la fase



acuosa y V_o el volumen de la fase orgánica. La determinación del coeficiente de reparto se realizó por triplicado, utilizando en cada caso un blanco.

III.2 Desarrollo de un método analítico para la cuantificación del α BIOF10 en fluidos biológicos

Considerando que el α BIOF10 es un compuesto nuevo del cual no existe información acerca de la metodología para su cuantificación, el siguiente paso fue desarrollar un método por CLAR para su cuantificación en plasma y orina.

Reactivos y equipo

- α BIOF10 100 % pureza, sintetizado en el laboratorio 122 del Departamento de Farmacia de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.
- Columna μ Bondapak C_{18} , 10 micras, de 300 x 3.9 mm Waters
- Columna μ Bondapak C_{18} Ciano, 10 micras, de 300 x 3.9 mm Waters
- Columna Nucleosil C_8 , 5 micras, de 250 x 4.6 mm Macherey-Nagel
- Columna Ciano - Fase Normal, 10 micras, de 300 x 3.9 mm Waters
- Columna NH_2 - Fase Normal, 10 micras, de 300 x 3.9 mm Waters
- Metanol. Mallinckrodt grado cromatográfico
- Acetonitrilo, Mallinckrodt grado cromatográfico
- Agua HPLC
- Baño de ultrasonido Branson, modelo 5210
- Balanza analítica OHAUS, modelo AS200
- Cromatógrafo de líquidos Waters equipado con:
 - Bomba modelo M45
 - Inyector manual Reodyne modelo 7125
 - Detector de UV de arreglo de diodos modelo 991

III.2.1 Preparación de la solución de prueba del α BIOF10 para el desarrollo el método

Pesar con exactitud una cantidad equivalente a 5 mg del α BIOF10, transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL, disolver en 10 mL de metanol RA y someterlo a baño de ultrasonido por 10 minutos. Dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con el mismo disolvente. Tomar una alícuota de 1 mL y llevar a un volumen de 10 mL con metanol RA. Se obtiene una concentración final de 20 μ g/mL (*solución de trabajo del α BIOF10*).

III.2.2 Selección de la fase estacionaria y la fase móvil

Empleando el paquete estadístico Statgraphics™, se realizó un diseño de experimentos por el método Simplex para la seleccionar la columna cromatográfica más adecuada que permitiera obtener un tiempo de corrida relativamente corto para el α BIOF10, eligiendo el tiempo de retención (T_r) como variable de respuesta y como variables



independientes la polaridad de la columna y de la fase móvil. En la tabla 3.1 se muestran las condiciones experimentales propuestas y las cuales fueron utilizadas durante el estudio. Simultáneamente se determinó la longitud de onda de máxima absorbancia empleando el detector de arreglo de diodos. En cada corrida se inyectaron 25 μL de la *solución de trabajo del αBIOF10* .

Tabla 3.1

Diseño de experimentos para seleccionar la fase estacionaria

Fase estacionaria		Fase móvil		Factor respuesta
columna	polaridad	disolventes	polaridad	Tr
C ₁₈ ciano	0	MeOH 100%	0	_____
NH ₂ FN	1	ACN:H ₂ O (95:5)	-1	_____
C ₁₈ ciano	0	ACN 100%	-1.41	_____
CN FN	1.41	MeOH 100%	0	_____
C ₈	-1	H ₂ O:ACN (95:5)	1	_____
C ₁₈	-1.41	MeOH 100%	0	_____
C ₈	-1	ACN:H ₂ O (95:5)	-1	_____
NH ₂ FN	1	H ₂ O:ACN (95:5)	1	_____
C ₁₈ ciano	0	H ₂ O 100%	1.41	_____
C ₁₈ ciano	0	MeOH 100%	0	_____

FN = fase normal

Una vez seleccionada la columna se utilizó un diseño de experimentos para seleccionar la polaridad de la fase móvil que produjera un tiempo de retención adecuado. En este caso la variable independiente fue la polaridad de la fase móvil y los parámetros de respuesta a evaluar fueron el tiempo de retención y la simetría. En la tabla 3.2 se observan las condiciones experimentales evaluadas. Los límites establecidos fueron de 0 a 1. En cada caso se inyectaron 25 μL de la *solución de trabajo del αBIOF10* .

Basándose en los resultados obtenidos en el diseño anterior y con el fin de aumentar la superficie de respuesta mediante el proceso de optimización Simplex, se evaluó la proporción de los disolventes de la fase móvil ideal para obtener un tiempo de análisis corto y una simetría de 1.0. Los límites establecidos fueron para el agua de 0.1 a 0.3, para el metanol de 0.4 a 0.7 y para el acetonitrilo de 0.1 a 0.3, según se muestra en la tabla 3.3.



Tabla 3.2

Diseño experimental para la selección de la fase móvil

Fase móvil (Proporción)			Factor respuesta	
H ₂ O	MeOH	ACN	Tr	Simetría
0.33	0.33	0.33	_____	_____
1.0	0.0	0.0	_____	_____
0.15	0.15	0.7	_____	_____
0.0	0.5	0.5	_____	_____
1.0	0.0	0.0	_____	_____
0.5	0.5	0.0	_____	_____
0.7	0.15	0.15	_____	_____
0.0	0.0	1.0	_____	_____
0.15	0.7	0.15	_____	_____
0.0	1.0	0.0	_____	_____
0.5	0.0	0.5	_____	_____

Tabla 3.3

Diseño experimental para la selección de la fase móvil.

Aumento de la superficie de respuesta

Fase móvil (Proporción)			Factor respuesta	
H ₂ O	MeOH	ACN	Tr	Simetría
0.1	0.7	0.2	_____	_____
0.3	0.4	0.3	_____	_____
0.2	0.7	0.1	_____	_____
0.15	0.55	0.3	_____	_____
0.3	0.55	0.15	_____	_____
0.25	0.5	0.25	_____	_____
0.2	0.6	0.2	_____	_____
0.3	0.4	0.3	_____	_____



III.3 Método analítico para la cuantificación del α BIOF10 y el sulfóxido de α BIOF10 en plasma y orina de borrego

Reactivos y equipo

- α BIOF10 y sulfóxido de α BIOF10 (SO α BIOF10) 100 % pureza, sintetizados en el laboratorio 122 del Departamento de Farmacia de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.
- Sulfóxido de albendazol (SOAlb), Smith-Kline and Beecham Pharmaceuticals
- Metanol grado cromatográfico. Mallinckrodt
- Acetonitrilo grado cromatográfico, Mallinckrodt
- Agua bidestilada y desionizada
- Metanol grado R. A., Baker
- Plasma y orina de borrego donado por el INIFAP - Plantel Cuernavaca
- Cromatógrafo de líquidos Shimadzu equipado con bomba modelo LC10AS, inyector automático modelo SCL10A, detector de UV longitud de onda variable, modelo SPD10AV, controlador maestro modelo SIL10A.
- Columna μ Bondapak C18, 10 micras, de 300 x 3.9 mm Waters
- Baño de ultrasonido modelo 5210, Branson
- Baño de agua Lab-line modelo Imperial IV
- Balanza analítica modelo 7125, OHAUS
- Cartuchos de extracción en fase sólida, C₁₈ Waters
- Manifold para extracción en fase sólida

Lavado del material

El material empleado fue lavado con detergente, enjuagado con abundante agua destilada y sumergido durante 12 horas en una solución de ácido nítrico diluido (10%). Finalmente se enjuagó con agua grado HPLC y se secó antes de ser usado.

III.3.1 Condiciones cromatográficas

De acuerdo a los resultados obtenidos las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

- * Columna μ Bondapak C₁₈, 10 micras, 300 x 3.9 mm., Waters
- * Fase móvil metanol, acetonitrilo y agua HPLC 40: 30: 30
- * Velocidad de flujo de 1.0 mL/min.
- * Presión aproximada de 140 Kg/cm²
- * Temperatura ambiente
- * Tiempo de corrida de 14 min.
- * Longitud de onda 304 nm
- * Volumen de inyección 20 μ L

La fase móvil se desgasificó en baño de ultrasonido y con vacío durante 15 minutos.



III.3.2 Preparación de la curva de calibración en fluidos biológicos

Solución patrón del estándar de referencia del α BIOF10 y del SO α BIOF10

Pesar con exactitud una cantidad equivalente a 2.5 mg del patrón referencia del α BIOF10 y 2.5 mg del SO α BIOF10, transferirlos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 5 ml, disolver en metanol HPLC y someterlo a baño de ultrasonido por 10 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con el mismo disolvente. Se obtiene una concentración final de 500 $\mu\text{g/mL}$ (*solución patrón del α BIOF10 y del SO α BIOF10*), una alícuota de 0.5 mL de la *solución patrón* de α BIOF10 y del SO α BIOF10 en metanol, se transfiere cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, llevar a volumen con plasma u orina de borrego (*solución de trabajo: 25 $\mu\text{g/mL}$*).

Solución patrón del estándar interno

Pesar el equivalente a 1.5 mg del SOA1b, transferir cuantitativamente a un matraz volumétrico de 10 mL, disolver en metanol HPLC y someterlo a baño de ultrasonido por 10 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con el mismo disolvente. Se obtiene una concentración final de 150 $\mu\text{g/mL}$ (*solución patrón del estándar interno*).

Curva de calibración

A partir de la *solución de trabajo* de α BIOF10 y de SO α BIOF10 a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$, se realizaron diluciones sucesivas para obtener los estándares correspondientes a la curva de calibración. En la figura 3.1 se muestra el procedimiento empleado para la preparación de la curva de calibración.



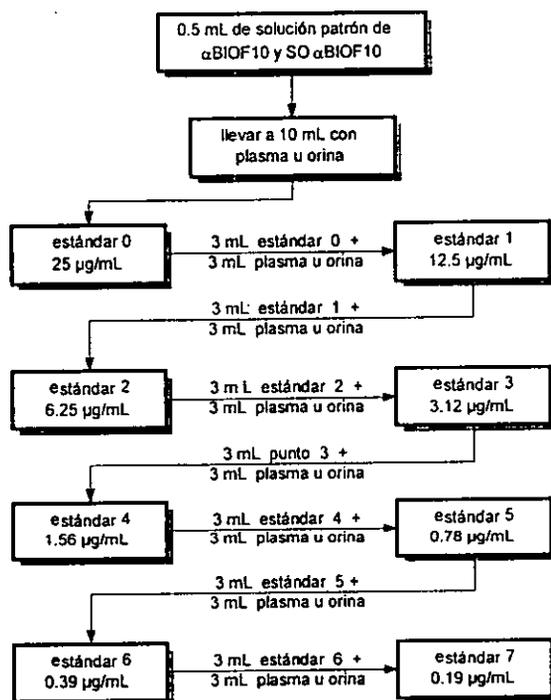


Figura 3.1

Preparación de la curva de calibración del α BIOF10 y SO α BIOF10 en fluidos biológicos.

III.3.3 Procedimiento

En un tubo de ensaye de 10 mL con tapón de rosca, colocar 3 mL de la matriz biológica (plasma u orina), adicionar 150 μ L de la *solución patrón* de estándar interno (SOAlb, 150 μ g/mL). Agitar el tubo durante 30 seg. en un agitador mecánico tipo Vortex, tomar una alícuota de 2 mL y transferirlo a un cartucho de extracción en fase sólida Sep-Pak[®] C₁₈ (previamente activado con 5 mL de metanol y 4 mL de agua HPLC), el cual se lava con 20 mL de agua HPLC. El α BIOF10, el SO α BIOF10 y el SOAlb son eluidos del cartucho con 3 mL de metanol R.A. recibiendo los en un tubo para después evaporar a sequedad en baño de agua a 40°C y bajo corriente de nitrógeno. El residuo se reconstituye con 0.5 mL de metanol HPLC inyectando 20 μ L al cromatógrafo de líquidos bajo las condiciones descritas en la sección III.3.1

En la figura 3.2 se presenta la secuencia del método de extracción.



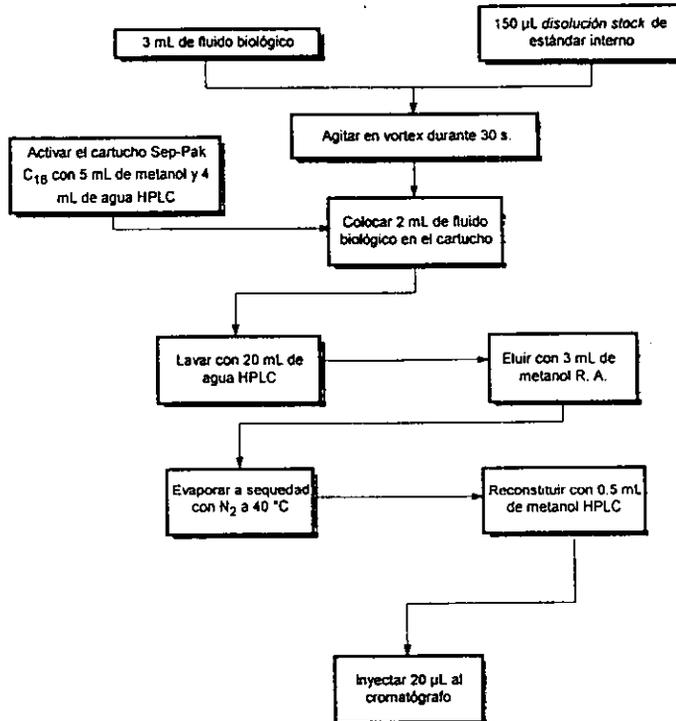


Figura 3.2

Esquema del método de extracción empleado para el α BIOF10 y SO α BIOF10 en fluidos biológicos.

III.4 Validación

La validación del método en plasma y orina de borrego se realizó tomando como base las guías oficiales⁴⁰⁻⁴³ y consistió en la evaluación de los siguientes parámetros:

III.4.1 Especificidad

Dado que el estudio se llevaría a cabo en borregos y que éstos se encuentran bajo regímenes alimenticios controlados y libre de medicación, la especificidad del método se determinó evaluando la no interferencia de la matriz biológica (plasma y orina de borrego) en la cuantificación del α BIOF10, el SO α BIOF10 y el estándar interno, el sulfóxido de albendazol. La prueba se efectuó analizando, bajo el método propuesto el fluido biológico de 3 borregos y se determinó si se presentaban interferencias en la región cromatográfica de los analitos de interés.



III.4.2 Linealidad

El intervalo de trabajo en plasma y en orina de borrego se fijó entre 0.19 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$. Para su caracterización se preparó una curva de calibración en el fluido biológico bajo estudio a concentraciones de 0.19, 0.39, 0.78, 1.56, 3.12, 6.25 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$ tanto para el αBIOF10 como para el $\text{SO}\alpha\text{BIOF10}$.

A cada curva se le realizó un análisis de mínimos cuadrados, tomando a la concentración como variable "X" y la respuesta (altura relativa del principio activo de interés respecto al estándar interno) como variable "Y".

La evaluación de la función respuesta consistió en la verificación de la consistencia de las curvas generadas durante dos días y del coeficiente de determinación de la recta generada, el cual no debería ser menor a 0.98.

III.4.3 Exactitud y Precisión

La Precisión se evaluó en dos etapas, precisión interdía y precisión intradía. Para este fin, se emplearon los mismos estándares de la curva de calibración para ambos analitos y en los dos fluidos biológicos, las cuales se procesaron por triplicado durante dos días para la precisión interdía y por triplicado en un solo día para la precisión intradía.

Para la precisión interdía se obtuvo el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación en los diferentes días que duró el experimento, tomándose como criterio que el coeficiente de variación fuera menor al 15% (menor de 20% en la CMC).

Para la precisión intradía, se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de todas las muestras de este experimento, tomándose como criterio que el coeficiente de variación fuera menor al 15% (menor de 20% en la CMC).

La exactitud se evaluó como la prueba de eficiencia de extracción, la cual se realizó preparando los estándares de αBIOF10 y $\text{SO}\alpha\text{BIOF10}$ en el fluido biológico y en metanol, ambos a las mismas concentraciones que en la curva patrón por triplicado.

El recobro absoluto se obtuvo al comparar el promedio (3 curvas = intradía y 6 curvas = interdía) de la respuesta de cada concentración obtenida de cada analito entre la respuesta del estándar interno en el fluido biológico contra la correspondiente en metanol. La relación se expresó en porcentaje de extracción.

Se evaluó que el promedio de la concentración interpolada en ambos experimentos de precisión no se alejara más del 15% de las concentraciones adicionadas (menor de 20% en la CMC).



III.4.4 Límite de Cuantificación (CMC) y Límite de Detección (CMD)

Se estableció haciendo diluciones sucesivas de la concentración de 0.19 $\mu\text{g/mL}$ para ambos compuestos y analizándolas mediante el método propuesto, buscando obtener la dilución que produjera una señal 10 veces a la señal del ruido para la determinación del límite de cuantificación (CMC) y 3 veces para el límite de detección (CMD), las cuales debían haber cumplido con el criterio de $\pm 20\%$ para la exactitud y precisión.

III.4.5 Estabilidad

La evaluación de la estabilidad se llevó a cabo de la siguiente manera:

- Estabilidad de la muestra a corto plazo.

Se prepararon muestras de plasma y orina adicionadas de αBIOF10 o $\text{SO}\alpha\text{BIOF10}$ según el caso; se procesaron por triplicado a cada concentración (de 0.19, 1.56 y 12.5 $\mu\text{g/mL}$) y se realizó la extracción a las 0, 3 y 6 horas después de haber sido descongeladas. La cuantificación se realizó contra una curva patrón preparada el mismo día.

- Estabilidad a ciclos de congelación - descongelación.

Las muestras para el análisis de la precisión intradía se almacenaron y se sometieron a 3 ciclos de congelación - descongelación ($-20^\circ\text{C}/\text{T.A.}$) de 24 horas cada uno. Al final de este período, se procesaron por triplicado a cada concentración y se cuantificaron contra una curva patrón preparada el mismo día. La concentración promedio obtenida, se comparó contra la obtenida a tiempo cero.

- Estabilidad de la muestra a largo plazo en condiciones de almacenamiento a -20°C .

Se prepararon muestras de plasma u orina adicionada de αBIOF10 o $\text{SO}\alpha\text{BIOF10}$ según el caso; se procesaron por triplicado cada concentración a los 15, 30, 45 y 90 días, se cuantificaron interpolando la relación de altura obtenida con respecto a una curva patrón preparada el mismo día del análisis, evaluándose la consistencia de resultados a través del tiempo.

Las muestras se consideraron estables si cumplían con los criterios de precisión y exactitud.



III.5 Estudio de Farmacocinética en borregos

III.5.1 Etapa I. Estudio preliminar

Este estudio se realizó con el fin de determinar si el compuesto α BIOF10 se absorbía por vía oral así como para evaluar la adecuabilidad del método analítico desarrollado para la cuantificación del α BIOF10 y sus metabolitos.

Reactivos y equipo

- Tubos heparinizados de 10 mL (Vacutainer, 143 unidades de heparina sódica/tubo, lote M 1287).
- Tubos con tapón de rosca con una gota de tolueno.
- Agujas estériles para vacío Vacutainer
- Bolsas de polietileno para la recolección de orina
- Probeta de vidrio de 1000 mL
- Centrifuga
- Congelador a -20°C

Formulación administrada

α BIOF10 suspensión, conteniendo 5 g del α BIOF10 por cada 100 mL. Formulación desarrollada en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química, UNAM. (Apéndice A).

Sujetos de estudio

Se seleccionó 1 borrego macho *pelibuey* con peso de 40 Kg (Apéndice B). El animal se encontraba en buen estado de salud y no se le había administrado ningún otro medicamento por lo menos 1 mes antes del estudio. El borrego se mantuvo en corrales acondicionados para estancias cortas de animales de mediana talla. El protocolo diseñado para la realización del estudio fue aprobado por el comité de investigación del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) plantel Cuernavaca, lugar en donde se desarrolló el estudio.

Diseño del experimento

El borrego recibió una dosis oral de 15 mg/Kg de peso de α BIOF10. El animal se mantuvo en ayuno durante 12 horas antes del estudio y hasta que transcurrieron 4.0 h después de la administración de la suspensión, la ingesta de agua fue de 1 L cada hora durante las primeras cuatro horas posterior a la administración y después del desayuno la ingesta de agua fue *ad libitum*.

Horario de toma de muestra y su conservación

Muestras de plasma

Se colectaron muestras de 8-10 mL de sangre de la vena yugular en tubos Vacutainer heparinizados. Las muestras sanguíneas se tomaron a los siguientes tiempos: justo



antes de la administración (blanco), 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 102, 144 y 168 horas.

Las muestras fueron centrifugadas a 3000 r.p.m. durante 15 min. El plasma se transfirió a tubos de vidrio limpios, y etiquetados. Todas las muestras se congelaron sin conservadores y se guardaron a -20°C hasta su análisis.

Muestras de orina

Se colectó el total de la orina eliminada correspondiente a cada tiempo de muestreo, se anotó el volumen total y posteriormente se tomaron muestras de 10 mL en tubos con tapón de rosca a los cuales se les había adicionado una gota de tolueno como conservador. El horario de muestreo fue el siguiente: antes de la administración (blanco), 0-4, 4-8, 8-24, 24-32, 32-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144 y 144-168 horas después de la administración.

Las muestras fueron centrifugadas a 3000 r.p.m. durante 15 min. La orina se transfirió a tubos de vidrio limpios y etiquetados. Todas las muestras se congelaron a -20°C hasta su análisis.

III.5.2 Etapa II. Estudio de farmacocinética

Se seleccionaron 7 borregos: 3 hembras y 4 machos, entre los 20 y 40 Kg de peso, los cuales recibieron una dosis oral de 12 mg/Kg de la suspensión de αBIOF10 . Los animales se mantuvieron en ayuno durante 12 horas antes del estudio permitiéndose la ingestión del agua *ad libitum* hasta el momento del estudio. La ingestión de la comida se permitió hasta 4.0 h después de la administración de la suspensión. Para el estudio de excreción urinaria, los animales tomaron 1 L de agua cada hora durante las primeras cuatro horas, después del desayuno la ingesta de agua fue *ad libitum*.

Horario de toma de muestra y su conservación

Muestras de plasma

Se tomaron las mismas consideraciones del estudio preliminar, modificándose únicamente el tiempo de muestreo, el cual quedo de la siguiente manera: justo antes de la administración (blanco), 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24,30, 36, 48, 72, 96, 102, 144 y 168 horas.

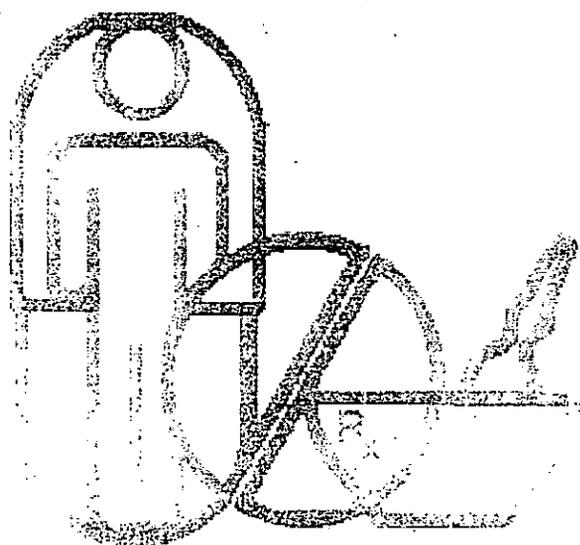
Muestras de orina

La toma de muestras urinarias se ajustó al siguiente horario: antes de la administración (blanco), 0-4, 4-8, 8-24, 24-32, 32-48, 48-72, 72-96. 96-120, 120-144 y 144-168.

Análisis Estadístico de los datos del estudio de Farmacocinética

Los parámetros farmacocinéticos se determinaron utilizando el programa PCNONLIN 4.0™ y PKAnalyst™. Para el análisis estadístico se utilizó el paquete Origin 4.1®.





Biotaroma

IV.
Resultados y
Análisis

El desarrollo de un nuevo fármaco es costoso y requiere de la participación de las diferentes áreas que conforman el área de la salud, como lo son: la farmacognosia, síntesis, farmacología, tecnología, biofarmacéutica, etc. con el fin de efectuar las pruebas que determinen su mecanismo de acción, eficacia, seguridad, biodisponibilidad y adecuada dosificación.

En la actualidad un programa óptimo de desarrollo de un fármaco, debe considerar en su etapa inicial, la evaluación de las propiedades fisicoquímicas del candidato así como la actividad farmacológica y una vez establecidos estos parámetros, se efectúan los estudios de farmacocinética, primeramente en animales y posteriormente en humanos. Este tipo de estudios tiene como objetivo el diseñar y/o optimizar los regímenes de dosificación.

IV.1 Determinación de las propiedades fisicoquímicas

IV.1.1 pKa

Después de obtener los espectros de absorción del α BIOF10 a los diferentes valores de pH en los rangos 200-800 nm se encontró que el α BIOF10 tan sólo absorbe en el rango UV, observándose que presenta 2 longitudes de onda de máxima absorción: 220 nm ($A=0.5563$ con una dilución 1:10) y 302 nm ($A=0.18123$ con una dilución 1:10) a pH de 1.0, estos máximos representan a la especie protonada. La molécula neutra a un pH de 2.0 demostró tener una baja absorción a estas longitudes de onda 220 nm ($A=0.5661$) y 302 nm ($A=0.1517$). (Figura 4.1).

De los 2 máximos, se seleccionó la longitud de 302 nm, ya que en esta longitud de onda se eliminan las posibles interferencias de las soluciones amortiguadoras.



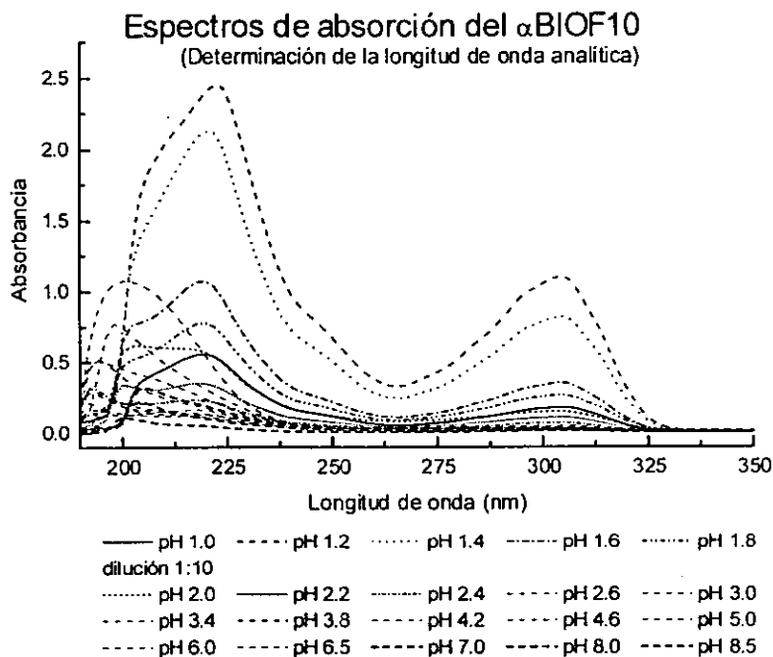


Figura 4.1

Espectros de absorción de las disoluciones de α BIOF10 procedentes de los diferentes valores de pH.

Una vez seleccionada la longitud de onda analítica, se obtuvieron los valores de absorbancia de las soluciones de α BIOF10 en las diferentes soluciones amortiguadoras, los resultados obtenidos se ajustaron a la siguiente ecuación:

$$\log A = \log \left\{ E_S(S) + E_{SH}(S) \left[\frac{H^+}{K_a} \right] \right\} \quad \text{ecuación 4.1}$$

la cual representa tanto a la especie protonada como a la especie neutra del α BIOF10, en donde $\log A$ es el logaritmo de la absorbancia, E_s y E_{SH} representa el coeficiente de extinción molar de las especies neutra y protonada respectivamente, S es la solubilidad, H es la concentración de protones y K_a es la constante de acidez.



Cuando:

$$\left[\frac{H^+}{K_a}\right] \rightarrow 0$$

$$\log A = \log E_S(S_0)$$

ecuación 4.2

$$\left[\frac{H^+}{K_a}\right] \gg 1$$

$$\log A = \log E_{SH}(S_0) \left[\frac{H^+}{K_a}\right] \Rightarrow \log \frac{E_{SH}(S_0)}{K_a} - \log[H^+]$$

$$\log A = \log \frac{E_{SH}(S_0)}{K_a} + pH$$

ecuación 4.3

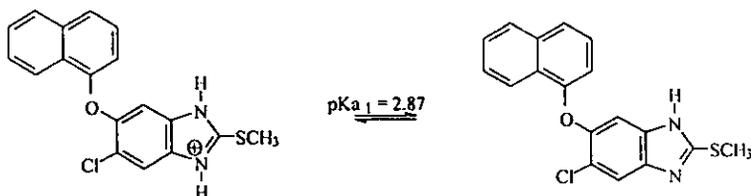
Igualando ambas ecuaciones y despejando el pH se obtiene la ecuación del punto en donde se interceptan ambas líneas rectas, este punto de intersección representa el valor del pH en donde tenemos el 50% de ambas especies, es decir el pKa.

$$pH = \log E_S(S_0) - \log \frac{E_{SH}(S_0)}{K_a} = \log \frac{E_{SH}}{K_a E_S}$$

ecuación 4.4

Una vez obtenidos los valores de absorbancia a los diferentes valores de pH, se graficó el logaritmo de la absorbancia en función del pH, encontrándose la presencia de dos rectas que representan el comportamiento del α BIOF10 (figura 4.2), la cual corresponden a la especie protonada y la especie neutra. Los valores de la regresión lineal para cada uno de las rectas se sustituyeron en la ecuación 4.4, encontrándose tanto con el método gráfico como con el matemático un valor de pKa 2.87 del α BIOF10, por lo que este nuevo compuesto presenta características de base débil.

El comportamiento de la especie protonada del α BIOF10 se representa en la siguiente ecuación:



Dado que únicamente la fracción no ionizada es absorbida y que esta depende directamente del valor del pKa del fármaco y del pH del medio en el tracto gastrointestinal. Considerando que el α BIOF10 tiene un pKa de 2.87 se comporta como una base débil, teóricamente la absorción deberá llevarse a cabo en el intestino.



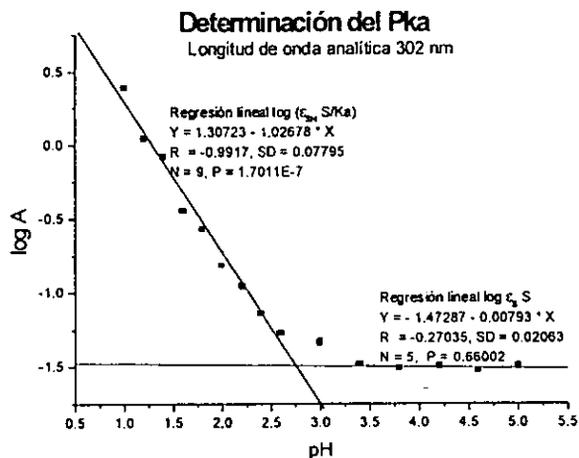


Figura 4.2
Determinación del pKa del α BIOF10

IV.1.2 Solubilidad

Se encontró que 24 horas era el tiempo necesario para llegar al equilibrio en los disolventes de prueba. En la tabla 4.1 se presentan los resultados de la solubilidad del α BIOF10 determinada en los disolventes mencionados en el punto III.1.2. Como se puede observar en la tabla 4.1 el α BIOF10 presentó una baja solubilidad en todos los disolventes estudiados siendo ligeramente más soluble en disolventes orgánicos. Estos datos son semejantes a los obtenidos con otros bencimidazoles¹³ y hacen pensar que la disolución es el factor limitante en la absorción de este grupo de antihelmínticos.

El α BIOF10 es prácticamente insoluble en la mayoría de los disolventes como lo muestra la tabla 4.1, en soluciones acuosas su solubilidad es baja, por lo que se espera que su absorción en el tracto gastrointestinal sea pequeña y en forma lenta.



Tabla 4.1
Solubilidad del α BIOF10

Disolvente	Solubilidad (mg/mL)
Sol. Amortiguadora de fosfatos pH = 7.4	> 0.00002
Sol. Amortiguadora de fosfatos pH = 6.0	0.00047
Sol. Amortiguadora de fosfatos pH = 2.2	0.00380
Sol. Amortiguadora de fosfatos pH = 1.3	0.00620
NaOH 0.1 N	0.00032
HCl 0.1N	0.010
Acetonitrilo	0.009
Acetona	0.038
Propilenglicol	0.041
Hexano	0.062
Metanol	0.100
Dimetil sulfóxido	0.210

IV.1.3 Coeficiente de partición aparente

Los resultados experimentales demostraron que el α BIOF10 tiene un coeficiente de partición octanol - agua de 27.63 ($\log P = 1.44$) con un coeficiente de variación de 3.54, lo cual demuestra que el compuesto es de carácter liposoluble. Este valor de coeficiente de partición correspondiente primordialmente a la especie neutra del α BIOF10.

Dado que es bien conocido que fármacos con valor de $\log P$ entre 1 y 2 son factibles de ser absorbidos⁴⁴, los resultados muestran que la poca cantidad de fármaco que se encuentra disuelta y no ionizada será fácilmente absorbida.



IV.2 Desarrollo del método analítico para la cuantificación del α BIOF10 en fluidos biológicos

IV.2.1 Selección de la columna y la fase móvil

En la figura 4.3a se presenta la superficie de respuesta obtenida por el método Simplex para determinar la columna más adecuada para el análisis del α BIOF10, en la que se puede observar que las columnas indicadas son las no polares, por ello se seleccionó la columna de fase reversa C_{18} . La figura 4.3b muestra la superficie de respuesta para la determinación de la composición de la fase móvil, encontrándose que una mezcla ternaria de los disolventes Metanol, Acetonitrilo y Agua en una proporción 50:25:25 era la más adecuada para obtener un tiempo de retención corto y una simetría cercana al 1.0.

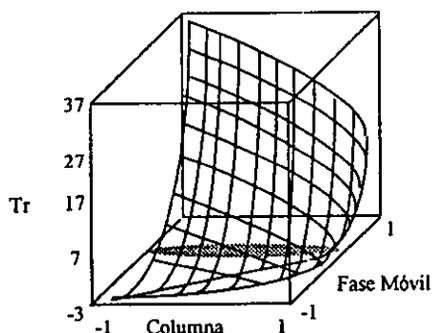


Figura 4.3a

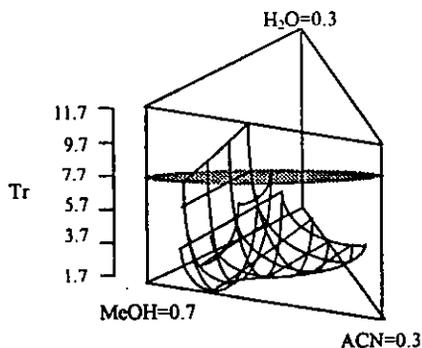


Figura 4.3b

Superficie de respuesta para la selección de la columna cromatográfica y de la fase móvil.
El área sombreada indica la zona de interés.

Una vez seleccionada la columna y la fase móvil a utilizar, se realizó un espectro de absorción para determinar la longitud de onda (λ) de máxima absorción en la fase móvil seleccionada. Como se muestra en la figura 4.4 el α BIOF10 presenta dos máximos: a 220 nm y a 304 nm. Para el presente estudio se seleccionó la λ de 304 nm con el fin de eliminar la interferencia de los componentes endógenos. En esta parte del estudio no se contaba aún con el metabolito el sulfóxido del α BIOF10, ni con el compuesto que pudiera emplearse como estándar interno.



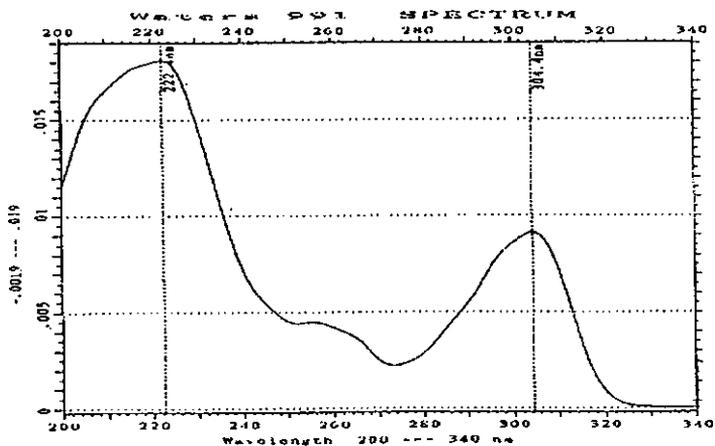


Figura 4.4

Determinación de la longitud de onda de máxima absorción del α BIOF10

IV.2.2 Selección del estándar interno

Para elegir el estándar interno se probaron diferentes compuestos con propiedades fisicoquímicas similares al α BIOF10, siendo el más adecuado el sulfóxido de albendazol (SOAlb), que como se muestra en la figura 4.5 presenta un espectro de absorción similar al α BIOF10.

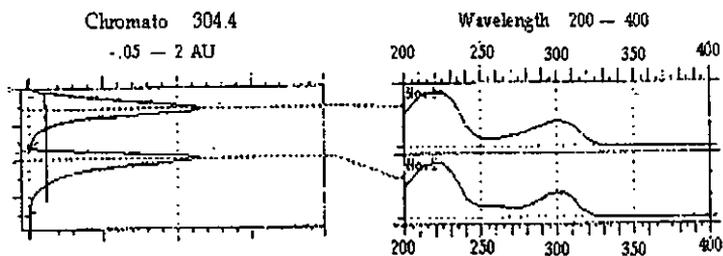


Figura 4.5

Selección del estándar interno

Para obtener una mejor resolución entre las señales cromatográficas del metabolito y del estándar interno, fue necesario modificar la proporción de la fase móvil a: Metanol: Acetonitrilo: Agua 40: 30: 30



IV.2.3 Selección del proceso de extracción

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas, se procedió a elegir el proceso de extracción. Para ello se revisaron los trabajos previos publicados en la literatura especializada, seleccionándose el método reportado por Hurtado y de la Peña⁴⁵, con el cual se establecieron las condiciones iniciales de análisis, que a través del desarrollo se fueron modificando hasta lograr una adecuada extracción de los analitos.

La preparación de la muestra consistió en la extracción de los compuestos de interés del plasma u orina con cartuchos de extracción en fase sólida Sep-Pack[®] C₁₈, un proceso de lavado de la muestra con 20 mL de agua HPLC y una posterior elución con 3 mL de metanol HPLC. Este procedimiento permitió una extracción adecuada del α BIOF10, el SO α BIOF10 y del estándar interno (sulfóxido de Albendazol), así como también de la sulfona del α BIOF10 (SO₂ α BIOF10).

IV.3 Validación del método analítico para la cuantificación del α BIOF10 y el SO α BIOF10 en plasma y orina de borrego

El método desarrollado fue validado con el fin de contar un método confiable, específico y sensible para cuantificar los analitos con exactitud y precisión en plasma y en orina. Los criterios para la validación del método analítico se basaron en las recomendaciones y lineamientos especificados por diferentes organismos internacionales.⁴⁰⁻⁴³

Los resultados de validación fueron los siguientes:

IV.3.1 Especificidad

En la figura 4.6 se presentan los cromatogramas obtenidos al analizar muestras blanco de plasma y muestras blanco de orina de borrego, así como las muestras adicionadas de α BIOF10, SO α BIOF10 y estándar interno (SOAlb) en la que se puede observar que los tiempos de retención fueron 4.9, 7.8 y 9.8 minutos respectivamente. No se encontraron interferencias de metabolitos potenciales (SO₂ α BIOF10) o compuestos endógenos del plasma y orina que interfirieran en la región cromatográfica del α BIOF10, SO α BIOF10 y del estándar interno (SOAlb), por lo que se considera que el método analítico es específico para la cuantificación de los analitos.



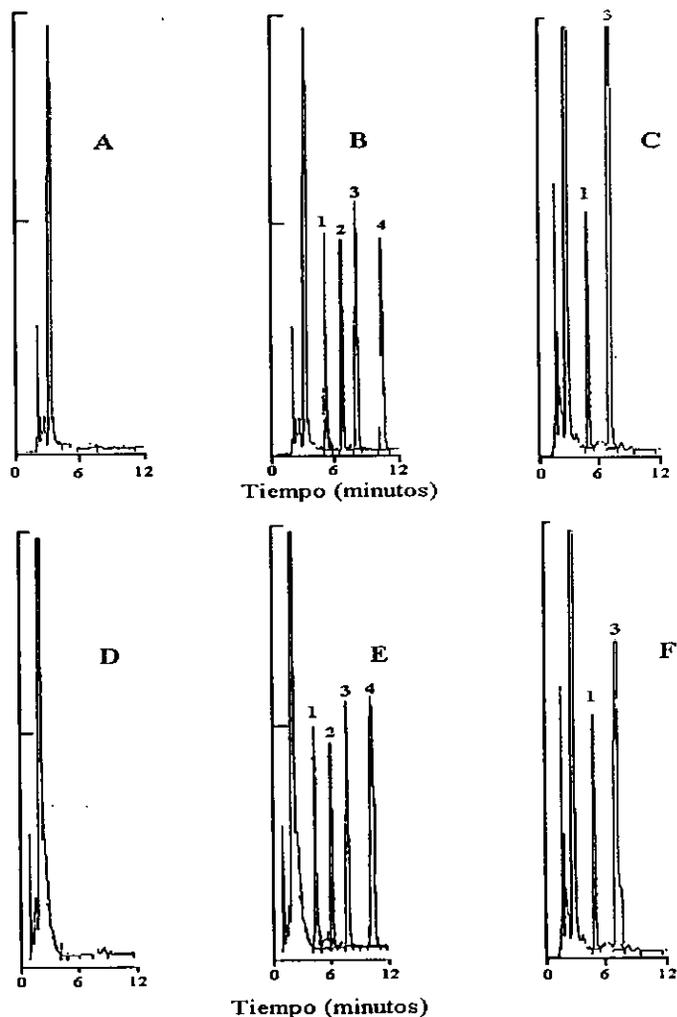


Figura 4.6

Cromatogramas representativos de: (A) blanco de plasma, (B) plasma adicionado de 1.56 $\mu\text{g/mL}$ de αBIOF10 , $\text{SO}\alpha\text{BIOF10}$ y $\text{SO}_2\alpha\text{BIOF10}$, (C) muestra plasmática de borrego después de la administración de 12 mg/Kg de αBIOF10 , (D) blanco de orina, (E) orina adicionada de 1.56 $\mu\text{g/mL}$ de αBIOF10 , $\text{SO}\alpha\text{BIOF10}$ y $\text{SO}_2\alpha\text{BIOF10}$, (F) muestra urinaria de borrego después de la administración de 12 mg/Kg de αBIOF10 . Las señales corresponden a: (1) sulfóxido de albendazol, (2) $\text{SO}_2\alpha\text{BIOF10}$, (3) $\text{SO}\alpha\text{BIOF10}$ y (4) αBIOF10 .



IV.3.2 Linealidad

El método mostró ser lineal en el intervalo de 0.193 a 12.5 µg/mL para ambos analitos. La figura 4.7 muestra las gráficas obtenidas para la linealidad del método del α BIOF10 y del SO α BIOF10 en plasma y orina, en las cuales se observa que el método es lineal en el rango de concentraciones estudiadas y en la tabla 4.2 se presentan los parámetros de la linealidad del método obtenidos para cada caso.

Tabla 4.2
Parámetros obtenidos en la evaluación de la linealidad del método

	SO α BIOF10		α BIOF10	
	plasma	orina	plasma	orina
pendiente	4.9383	4.7559	4.8090	4.8909
I. C.	4.8743 – 5.0023	4.5423 – 4.9695	4.7600 – 4.8580	4.8338 – 4.9480
intercepto	-0.0334	0.0482	0.0273	-0.1321
I. C.	-0.3814 – 0.3146	-0.9493 – 1.0457	-0.2357 – 0.2903	-0.7511 – 0.4869
ecuación de la recta	$y = -0.0334 + 4.9383 \cdot x$	$y = 0.0482 + 4.7559 \cdot x$	$y = 0.0273 + 4.8090 \cdot x$	$y = -0.1321 + 4.8909 \cdot x$
r	$0.999 \pm 4.125 \times 10^{-3}$	$0.999 \pm 2.346 \times 10^{-3}$	$0.999 \pm 7.353 \times 10^{-3}$	$0.999 \pm 7.353 \times 10^{-3}$
r ²	0.9996	0.9991	0.9991	0.9998
n	6	6	6	6
t _{tabla}	2.571	2.571	2.571	2.571
t _{calculada}	248.396	165.597	165.597	351.338

I. C. = intervalo de confianza



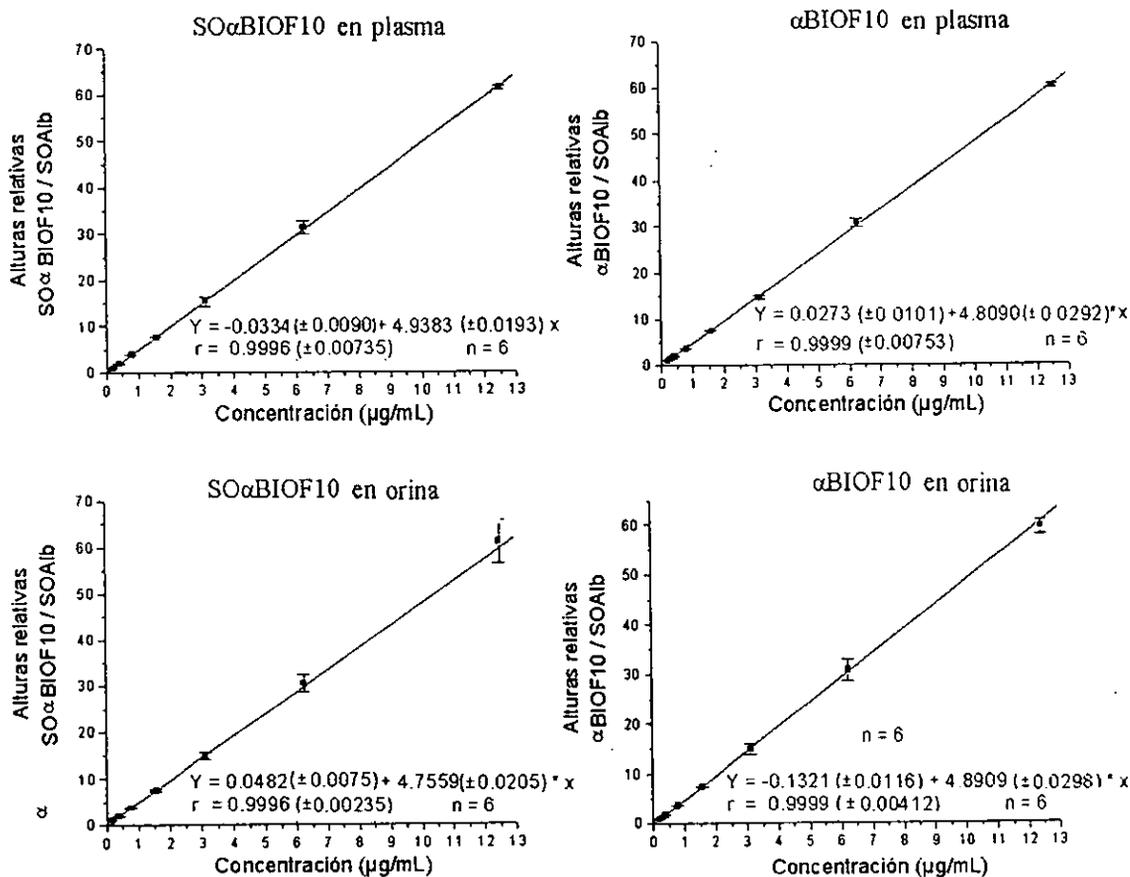


Figura 4.7
Linealidad del método analítico para cuantificar αBIOF10 y SOαBIOF10 en plasma y orina de borrego



IV.3.3 Exactitud y Precisión

La precisión intradía (o repetibilidad) sobre el intervalo de trabajo varió de 1.0 a 5.3% para el SO α BIOF10 y de 0.8 a 4.3 % para SO α BIOF10 en muestras plasmáticas (Tabla 4.3); y en las muestras de orina varió de 1.4 a 3.4 % para el SO α BIOF10 y de 1.2 a 3.9 % para el α BIOF10.

Al evaluar la precisión interdía (o reproducibilidad) los coeficientes de variación obtenidos oscilaron entre 1.8 a 4.5 % para el SO α BIOF10 y de 2.2 a 4.8 % para el α BIOF10. Las muestras de orina dieron valores de 1.3 a 5.3 % para el SO α BIOF10 y de 1.5 a 4.4 % para el α BIOF10.

Considerando que el límite de variación permitido para establecer como preciso un método analítico en fluidos biológicos es de 15 % y que en el límite de cuantificación (CMC) es de 20%,⁴⁰⁻⁴³ se puede concluir que el método analítico es preciso tanto para plasma como para orina.

La exactitud del método se evaluó con el porcentaje de recuperación, determinando la cantidad del analito recobrado después del proceso de extracción en la matriz biológica y comparándola con la respuesta obtenida en la solución metanólica. La media de recuperación para el α BIOF10 fue de 97.2 ± 2.4 y $93.1 \pm 2.3\%$ en plasma y orina respectivamente, en el caso del SO α BIOF10 y los valores obtenidos fueron de 97.8 ± 3.7 % en plasma y 99.6 ± 2.3 % en orina (ver tabla 4.3). Estos resultados muestran que el método presenta una extracción adecuada.

Con base a los resultados obtenidos, el método se estableció como preciso y exacto.

IV.3.4 Límite de cuantificación(CMC) y Límite de Detección(CMD)

El límite de cuantificación se estimó en 24 ng/mL para ambos analitos en plasma y en 12 ng/mL para el caso de muestras en orina.

El límite de detección se estimó en 7.2 ng/mL para los dos compuestos en plasma y de 3.6 ng/mL en las muestras de orina.



Tabla 4.3a
Exactitud y precisión del método en plasma de borrego

Concentración teórica (µg/mL)	Concentración experimental (media, µg/mL ± d.e.)		C.V. (%)		Recuperación (%)	
intradía (n=3)						
	SOαBIOF10	αBIOF10	SOαBIOF10	αBIOF10	SOαBIOF10	αBIOF10
0.19	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	5.3	4.3	91.2	96.1
0.39	0.38 ± 0.01	0.39 ± 0.01	2.4	2.7	96.5	99.7
0.78	0.77 ± 0.01	0.74 ± 0.01	1.7	0.8	99.0	94.5
1.56	1.53 ± 0.05	1.50 ± 0.03	3.3	1.9	98.2	95.8
3.12	3.22 ± 0.04	2.99 ± 0.07	1.4	2.3	103.1	95.6
6.25	6.05 ± 0.06	6.30 ± 0.16	1.0	2.6	96.8	100.8
12.5	12.45 ± 0.36	12.23 ± 0.22	2.9	1.8	99.6	97.8
interdía (n=6) en dos días						
0.19	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	4.5	4.7	95.6	96.9
0.39	0.38 ± 0.02	0.36 ± 0.02	4.5	4.1	97.5	92.3
0.78	0.77 ± 0.02	0.73 ± 0.04	2.2	4.8	99.0	92.8
1.56	1.53 ± 0.04	1.50 ± 0.05	2.6	3.2	98.1	96.2
3.12	2.93 ± 0.05	2.86 ± 0.07	1.8	2.5	93.6	91.6
6.25	6.05 ± 0.12	6.04 ± 0.17	3.1	2.8	96.8	96.7
12.5	12.51 ± 0.34	12.33 ± 0.27	2.7	2.2	100.1	98.6

Tabla 4.3b
Exactitud y precisión del método en orina de borrego

intradía (n=3)						
0.19	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.01	3.1	3.5	99.2	96.4
0.39	0.39 ± 0.01	0.36 ± 0.01	3.4	1.5	101.1	90.9
0.78	0.76 ± 0.02	0.74 ± 0.03	2.6	3.9	97.5	94.7
1.56	1.51 ± 0.04	1.47 ± 0.05	2.9	3.6	96.9	94.0
3.12	3.06 ± 0.04	2.82 ± 0.05	1.4	1.7	98.0	90.2
6.25	6.36 ± 0.10	5.82 ± 0.07	1.6	1.2	101.7	93.1
12.5	12.85 ± 0.22	11.54 ± 0.19	1.7	1.6	102.8	92.3
interdía (n=6) en dos días						
0.19	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	3.7	4.4	89.8	88.1
0.39	0.34 ± 0.01	0.36 ± 0.01	2.8	1.7	86.6	91.0
0.78	0.70 ± 0.04	0.74 ± 0.02	5.3	3.0	89.5	94.4
1.56	1.36 ± 0.07	1.49 ± 0.05	4.9	3.5	87.1	95.5
3.12	2.92 ± 0.05	3.12 ± 0.09	1.6	2.8	93.4	99.9
6.25	6.34 ± 0.08	6.44 ± 0.10	1.3	1.5	101.5	103.1
12.5	12.63 ± 0.19	11.95 ± 0.32	1.5	2.7	101.0	95.6



IV.3.5 Estabilidad

La tabla 4.4 muestra los resultados de la prueba de estabilidad a corto plazo a temperatura ambiente, en la tabla 4.5 se observan los resultados de estabilidad a largo plazo bajo condiciones de almacenamiento a -20°C y la tabla 4.6 la estabilidad bajo ciclos de congelación – descongelación a -20°C y Temperatura Ambiente; para los dos analitos en los dos fluidos.

Tabla 4.4
Estabilidad del αBIOF10 y el $\text{SO}\alpha\text{BIOF10}$ a corto plazo

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	αBIOF10			$\text{SO}\alpha\text{BIOF10}$		
	Tiempo (horas)			Tiempo (horas)		
	0	3	6	0	3	6
Datos plasmáticos (% de recobro)						
0.19	93.3	83.6	85.3	95.6	85.8	87.9
1.56	99.4	98.1	92.3	98.6	92.7	81.5
12.5	104.8	100.1	105.2	98.4	94.8	88.6
Datos urinarios (% de recobro)						
0.19	94.5	99.2	90.3	104.5	98.1	95.3
1.56	97.8	99.7	100.1	97.4	98.3	96.9
12.5	98.5	100.1	99.4	92.5	94.5	97.4

Tabla 4.5
Estabilidad del αBIOF10 y el $\text{SO}\alpha\text{BIOF10}$ a largo plazo

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	αBIOF10					$\text{SO}\alpha\text{BIOF10}$				
	Tiempo (meses)					Tiempo (meses)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	0	0.5	1.0	1.5	2.0
Datos plasmáticos (% de recobro)										
0.19	99.9	100.5	104.7	100.6	87.6	98.8	100.4	99.1	98.3	84.2
1.56	96.5	104.3	95.4	101.2	86.1	95.2	101.2	101.4	99.1	80.6
12.5	98.6	97.6	96.2	96.8	81.2	100.3	98.6	99.1	94.1	90.1
Datos urinarios (% de recobro)										
0.19	99.2	97.1	100.6	93.4	80.4	100.5	100.3	98.7	96.8	77.8
1.56	99.1	96.2	104.3	99.5	91.3	90.4	93.1	95.2	89.4	76.8
12.5	100.2	100.6	99.8	98.9	86.9	96.1	91.4	94.2	93.2	86.1



Tabla 4.6

Estabilidad del α BIOF10 y el SO α BIOF10 con ciclos de congelación - descongelación

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	α BIOF10				SO α BIOF10			
	Ciclos de congelación - descongelación							
	0	1	2	3	0	1	2	3
Datos plasmáticos (% de recobro)								
0.19	101.6	100.5	101.4	99.5	99.7	98.8	98.3	98.6
1.56	95.4	97.6	94.6	93.8	97.9	93.1	102.4	96.8
12.5	101.2	100.4	98.7	96.7	96.6	97.4	101.9	104.3
Datos urinarios (% de recobro)								
0.19	96.8	100.2	100.6	103.7	99.4	103.8	104.5	95.7
1.56	97.6	103.7	95.7	99.2	96.9	95.6	93.7	92.8
12.5	95.2	95.4	97.8	96.7	102.3	100.4	96.7	91.7

Las pruebas de estabilidad a corto plazo demostraron que tanto α BIOF10 como el SO α BIOF10 son estables a temperatura ambiente en los fluidos biológicos hasta por 6 horas. El estudio a largo plazo en condiciones de almacenamiento a -20°C indica que las muestras son estables por 1.5 meses. Las muestras pueden ser sometidas hasta por 3 ciclos de congelación/descongelación de 24 horas cada uno sin que sufran degradación.

Con base en los resultados obtenidos, se estableció que el método analítico es lineal en el intervalo de concentraciones de 0.193 a 12.5 $\mu\text{g/mL}$, exacto, preciso, los analitos son estables en plasma y orina de borrego bajo las condiciones de experimentación, por lo que se consideró adecuado para efectuar el estudio de farmacocinética.

IV.4 Estudio de Farmacocinética en borregos

IV.4.1 Etapa I. Estudio preliminar

Tomando en cuenta que el α BIOF10 es un fármaco nuevo, se decidió utilizar al borrego como modelo experimental animal, ya que entre los herbívoros es la especie animal más susceptible a la fascioliasis. La tabla 4.7 y la figura 4.8 muestran las concentraciones plasmáticas del SO α BIOF10 obtenidas a los diferentes tiempos de muestreo. El α BIOF10 no pudo ser detectado en ninguno de los tiempos, lo cual indica que se metaboliza rápidamente a sulfóxido. Estos datos concuerdan con lo reportado en la literatura para otros bencimidazoles tanto en animales como en humanos.^{22-28, 46-49}



Tabla 4.7

Concentraciones plasmáticas del SO α BIOF10 a los diferentes tiempos de muestreo después de la administración de una dosis de 12 mg/Kg del α BIOF10 por vía oral a un borrego. Estudio preliminar

Tiempo (h)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Tiempo (h)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
0	0	10	8.3151
0.5	0.1029	12	4.0899
1	0.0861	24	2.1997
2	0.2246	36	1.4644
3	0.8991	48	1.1524
4	1.9093	72	0.3379
5	3.5185	96	0.257
6	3.3934	120	0.1863
8	3.6987	168	0.0988

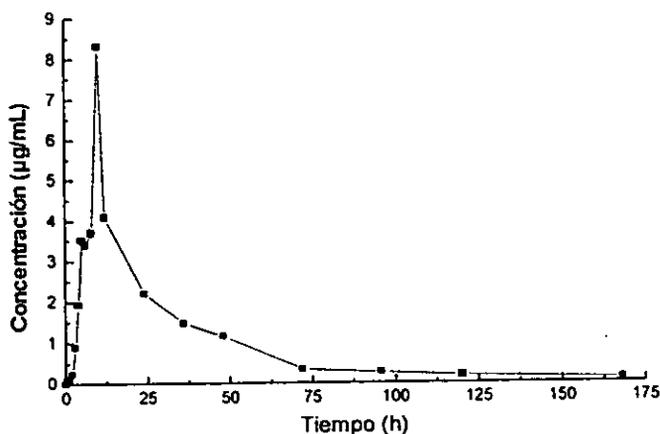


Figura 4.8

Perfil de concentración plasmática deSO α BIOF10 después de la administración de una dosis de 12 mg/Kg a un borrego.



De los resultados obtenidos en este estudio preliminar se encontró que el método analítico desarrollado era adecuado para la cuantificación del metabolito en plasma. Después de analizar los tiempos de muestreo se decidió incluir un tiempo de muestreo más a las 30 horas con el fin poder caracterizar adecuadamente el comportamiento del SO α BIOF10 en el borrego.

La figura 4.6 muestra el cromatograma de las muestras urinarias en donde se puede apreciar que el metabolito SO α BIOF10 se excreta por vía renal. Cabe mencionar que durante el presente estudio no se contó con una técnica adecuada de recolección de la orina y por lo tanto se presentaron problemas para su recolección principalmente en los intervalos de tiempo prolongados, por lo que no fue posible caracterizar la farmacocinética en este fluido y sólo se pudo establecer que el metabolito se excreta por vía renal.

IV.4.2 Etapa II. Estudio de farmacocinética

En la tabla 4.8 se presentan los valores promedios de concentración plasmática vs tiempo de SO α BIOF10 en 7 borregos y su representación gráfica se encuentra en la figura 4.9, en la que se puede observar la gran variabilidad entre los animales. El coeficiente de variación promedio de todos los niveles de concentración en todos los tiempos de muestreo fue de $20.3 \pm 9.9\%$.

Los datos se ajustaron a un Modelo Abierto de Dos Compartimentos (MADC) y en la tabla 4.9 se muestran los parámetros farmacocinéticos obtenidos en los que se observa que la absorción es lenta con una vida media de 6.17 ± 1.12 h, los niveles máximos se alcanzan a las 11 horas y su vida media de eliminación oscila entre las 13.54 y 24.99 horas.

Comparando los valores obtenidos en este estudio con los encontrados para el triclabendazol en borregos (ver tabla 2.3), se aprecia que la absorción es más rápida, y el metabolismo es extenso, lo cual hace pensar que al igual que en otros bencimidazoles^{21,25} la actividad fasciolicida del α BIOF10 se debe al metabolito. Este nuevo compuesto presenta una concentración máxima menor y la eliminación es similar (vida media de 16.0 a 19.5 h) con respecto al triclabendazol.

Con base en estos resultados y habiendo demostrado su eficacia en los estudios *in vitro* e *in vivo*, puede considerarse que este fármaco podría ser un sustituto del triclabendazol y por lo que sería interesante concluir con los estudios en otras especies animales.



Tabla 4.8
Valores promedio de concentración plasmática del SO α BIOF10 después de la administración de una dosis de 12 mg/Kg del α BIOF10 por vía oral en borregos

Tiempo (h)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) \pm d.e.	C.V. (%)	Tiempo (h)	Concentración ($\mu\text{g/mL}$) \pm d.e.	C.V. (%)
0	0.000 \pm 0.00	0.00	12	7.637 \pm 1.13	14.80
0.5	0.219 \pm 0.05	22.83	24	5.333 \pm 1.11	20.81
1	0.393 \pm 0.16	40.71	30	3.653 \pm 0.55	15.06
2	0.705 \pm 0.25	35.46	36	2.394 \pm 0.15	6.27
3	1.141 \pm 0.24	21.03	48	1.335 \pm 0.14	10.49
4	2.000 \pm 0.49	24.50	72	0.776 \pm 0.14	18.04
5	2.849 \pm 0.11	3.86	96	0.430 \pm 0.14	32.56
6	3.365 \pm 0.30	8.92	120	0.187 \pm 0.03	16.04
8	4.952 \pm 0.94	18.98	144	0.143 \pm 0.03	20.98
10	6.743 \pm 1.36	20.17	168	0.128 \pm 0.04	31.25

n=7 borregos

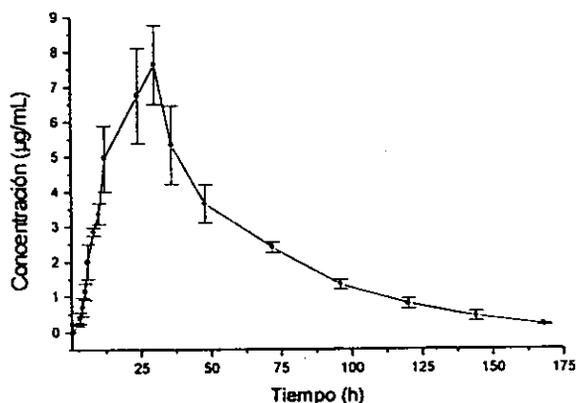


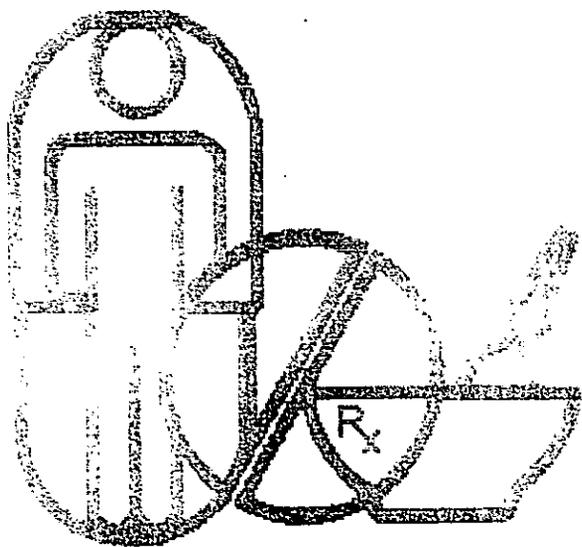
Figura 4.9
Valores promedio \pm d.e. de la concentración plasmática de SO α BIOF10 después de la administración de una dosis de 12 mg/Kg de α BIOF10 en 7 borregos.



Tabla 4.9
Parámetros farmacocinéticos promedio \pm d.e. del SO α BIOF10 obtenidos después de la administración oral de 12 mg/Kg de α BIOF10 en 7 borregos.

Parámetro farmacocinético	Valor \pm desviación estándar	C.V. (%)
ka	(h^{-1}) 0.1150 \pm 0.02	17.39
$t_{1/2 ka}$	(h) 6.17 \pm 1.12	18.15
ke	(h^{-1}) 0.0381 \pm 0.01	26.25
$t_{1/2 ke}$	(h) 18.95 \pm 4.05	21.37
k_{12}	(h^{-1}) 0.2270 \pm 0.57	251.10
k_{21}	(h^{-1}) 0.0248 \pm 0.01	40.32
α	(h^{-1}) 0.0557 \pm 0.02	35.91
$t_{1/2\alpha}$	(h) 14.21 \pm 5.71	40.18
β	(h^{-1}) 0.0189 \pm 0.004	21.16
$t_{1/2\beta}$	(h) 38.21 \pm 8.20	21.46
A	($\mu g/mL$) 15.55 \pm 10.16	65.34
B	($\mu g/mL$) 2.756 \pm 1.30	47.17
C	($\mu g/mL$) -18.020 \pm 9.96	-55.27
Cmax	($\mu g/mL$) 8.00 \pm 1.16	14.50
Tmax	(h) 11.4 \pm 0.98	8.60
ABC _{0\rightarrowt}	($\mu g h/mL$) 234.95 \pm 51.85	22.07
ABC _{0$\rightarrow$$\infty$}	($\mu g h/mL$) 238.39 \pm 52.01	21.81
TMR	(h) 46.25 \pm 4.83	10.44
Vd	(mL) 58.57 \pm 14.93	25.49
Cl	(mL/min) 38.76 \pm 16.96	43.76





Biotarma

V.

Conclusiones

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que:

- El α BIOF10 es un compuesto con baja solubilidad en soluciones acuosas y soluble en soluciones orgánicas. Es un compuesto ácido con valor de pKa de 2.87 y presenta un alto coeficiente de partición lípido/agua: 27.64.
- El método analítico desarrollado para la cuantificación del α BIOF10 y sus principales metabolitos en fluidos biológicos, resultó ser adecuado y confiable. El procedimiento para el tratamiento de las muestras es simple y rápido, e involucra una extracción directa utilizando cartuchos Sep-Pak[®]. Este método analítico fue preciso, exacto, selectivo y lineal en un intervalo de concentración de 0.19 a 12.5 $\mu\text{g/mL}$, y las muestras resultaron ser estables bajo las condiciones de experimentación y en almacenamiento hasta 1.5 meses a -20°C , por lo que se considera aplicable para la determinación del analito en plasma y orina.
- Al administrar una dosis oral de 12 mg/Kg en borregos, el α BIOF10 no pudo ser detectado a ninguno de los tiempos de muestreo, lo cual indica que el α BIOF10 se metaboliza completamente a sulfóxido de α BIOF10 (SO α BIOF10). La farmacocinética del metabolito se describe de acuerdo al Modelo Abierto de Dos Compartimentos (MADC) con una vida media de absorción de 6.17 horas, una vida media de eliminación de 18.95 h, Cmax de 8.0 $\mu\text{g/mL}$, tmax de 11.4 h, un Area bajo la Curva 238.39 $\mu\text{g}^*\text{h/mL}$, un volumen de distribución de 58.57 L y una depuración de 68.76 mL/min.

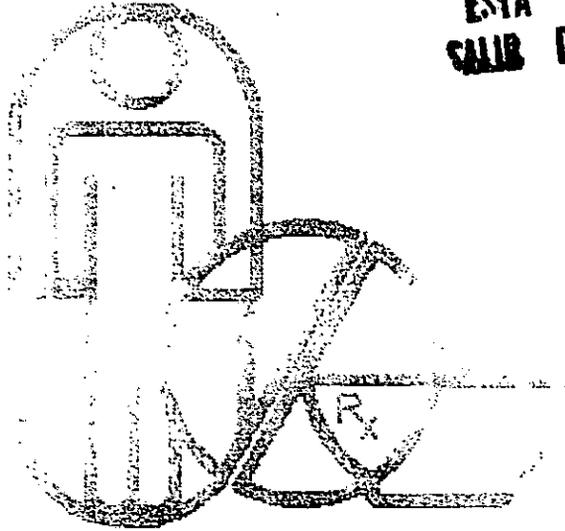
Con base en los resultados obtenidos y considerando su eficacia en los estudios *in vitro* e *in vivo*, puede considerarse que este fármaco podría llegar a ser un sustituto del triclabendazol y sería interesante continuar con los estudios, por lo que se propone:

- Determinar la biodisponibilidad absoluta de la administración oral con respecto a la intravenosa.
- Realizar estudios de unión a proteínas
- Concluir estudios de farmacocinética en otras especies animales de interés veterinario.

Este trabajo permitió fortalecer las líneas de investigación de las diferentes áreas involucradas e implementar metodología para la evaluación biofarmacéutica de nuevos fármacos, lo cual permitirá continuar con los estudios de algunas de las nuevas moléculas con actividad farmacológica que se están sintetizando en nuestro país.



ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Biotarma

VII.
Bibliografía

- 1.- Bruce J. I. New antihelmintics. *Int. J. Parasit.* 1987; 17: 131.
- 2.- Van den Bossche H., Rochette F., Horig C. Mebendazole and related anthelmintics. *Adv. Pharmacol. Chemother.* 1992; 19: 67.
- 3.- McKraken R. O., Stillwell W. H. A possible biochemical mode of action for benzimidazole anthelmintics. *Int. J. Parasitol.* 1991; 21: 99.
- 4.- Eckert J., Schneiteer G., Wolf K. Fasinex (Triclabendazole) a new fasciolicide. *Ver. Munch. Tierarztl. Wschr.* 1984; 91: 349.
- 5.- Boray J.C. Chemotherapy of Fasciolosis. *New South Wales Veterinary Proceedings.* 1982; 18: 42.
- 6.- Boray J.C., Crowfoot P.D., Strong M. B., Allson J. R., Schellenbaum M., Orelli Von M., Serasin G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* in sheep with triclabendazole. *Vet. Rec.* 1983; 113: 315-317.
- 7.- Castillo R. y Hernández A. Estudios sobre la síntesis, química y actividad in vitro contra la *Fasciola hepatica* de algunos derivados del benzimidazol. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 1991; 22 (2): 11.
- 8.- Ibarra Velarde O. F. Chemotherapeutic studies on parasitic Helminths. Ph. D. Thesis Brunel University. London, Great Britain. 1983; 1-235.
- 9.- Benenson, Abram S. El control de las enfermedades transmisibles en el hombre. Informe oficial de la Asociación estadounidense de Salud Pública. Publicación Científica No. 538. USA: Ed. Organización Panamericana de la Salud, 1992: 208-210.
- 10.- Flores C, R., Quiroz M, H., Ibarra V., F. Fasciolosis Volumen Conmemorativo Centenario del descubrimiento del Ciclo de la *Fasciola hepatica*, México, D.F.: INIFAP, 1986.
- 11.- Acha, Pedro A., Szyfres, Pedro N. ZOONOSIS y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Publicación Científica No. 503. USA: Ed. Organización Panamericana de la Salud, 1992: 689-696.
- 12.- Rew, C. W. and, Campbell, S. R. Chemotherapy of Parasitic Diseases, New York: Plenum Press, 1986: 239-244, 289, 326-327.
- 13.- Mckellar, Q.A., Scott, E.W. The benzimidazole anthelmintic agents-a review. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 1990; 13: 223-247.
- 14.- Le Jambre, L.F. Molecular variation in trichonstrongylid nematodes from sheep and cattle. *Act. Trop.* 1993; 53: 331-343.
- 15.- Craig, T.M., Huey, R.L. Efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* and *Fascioloides magna* in naturally infected calves. *Am. J. Vet. Res.* 1984; 45:1644-1645.
- 16.- Wolf, K., Eckert, J., Schneiter, G. Lutz, H. Efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep and goat. *Vet. Parasitol.* 1983; 13:145-150.





- 17.- Wessely, K., Reisching, H. L., Heinerman, M., Stempka, M. Human fascioliasis treated with triclabendazole (Fasinex[®]) for the first time. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1988; 182: 743-744.
- 18.- Loutan, L., Bouvier, M., Rojanawisut, B., Stalder, H., Rovon, M.C., Buescher, G., Polters, A. Single treatment of invasive fascioliasis with triclabendazole. *Lancet.* 1989; 8659 (2): 383.
- 19.- Robinsos, C.P. Triclabendazole. *Drugs of Today.* 1985; 21 (5): 227-233.
- 20.- Hennessy, D.R. The disposition of antiparasitic drugs in relation to the development of resistance by parasites of livestock. *Act. Trop.* 1994; 56: 125-141.
- 21.- Mohhamed-Ali, N.A.K., Bogan, I. A., Mariner, S. E., Richards, R. J. Pharmacokinetics of Triclabendazole alone or in combination with fenbendazole in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 1986; 9: 442-445.
- 22.- Hennessy, D.R., Lacey, E., Steel, J.W., and Prichard, R.K. The kinetics of triclabendazole disposition in sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1987; 10: 64-72.
- 23.- Sanyal, P.K. Pharmacokinetic study of triclabendazole in sheep and goat using a high performance liquid chromatography method. *Indian J. Pharmacol.* 1994; 18: 370-374.
- 24.- Prichard, R.K., Hennessy, D.R., and Steel, J.W. Prolonged administration: a new concept for increasing spectrum and effectiveness of anthelmintics. *Vet. Parasitol.* 1978; 4: 309-315.
- 25.- Oukessou, M., Toutain, P.L., Galtier, P., Alvinerie, M. Étude pharmacocinétique comparée du triclabendazole chez le mouton et le dromedaire. *Revue Élev. Méd. Vét. Pays. Trop.* 1991; 44 (4): 447-452.
- 26.- Sanyal, P.K. Kinetic disposition of triclabendazole in buffalo compared to cattle. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 1995; 18: 370-374.
- 27.- Kinabo, L.D.B., Bogan, J. A. Pharmacokinetics and efficacy of triclabendazole in goats with induced fascioliasis. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 1988; 11: 254-259.
- 28.- Kinabo, L.D.B., Bogan, J. A. Disposition of triclabendazole in horses, ponies and donkeys. *Equine Vet. J.* 1989; 21 (4): 305-307.
- 29.- Sanyal, P.K., Gupta, S.C. The efficacy and pharmacokinetics of long term low level intraruminal administration of triclabendazole in buffalo with induced fascioliasis. *Vet. Res. Communications.* 1996; 20(5): 461-468.
- 30.- Sanyal, P.K., Gupta, S.C. Efficacy and pharmacokinetics of triclabendazole in buffalo with induced fascioliasis. *Vet. Parasitol.* 1996; 63: 75-82.



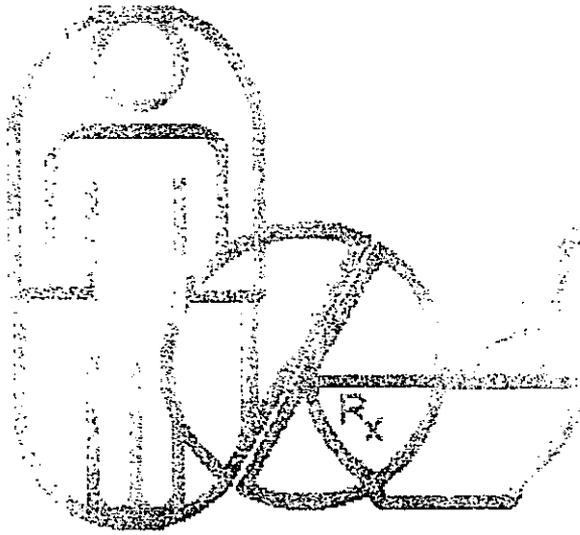
- 31.- Coles, G. C. The mechanism of action of some veterinary anthelmintics. In Perspectives in the Control of Parasite Disease in animals in Europe. UK: *Jolly, D.W. & Sommerville, J.M. Royal College of Veterinary Surgeons, 1978: 53-63.*
- 32.- Code of Federal Regulations. Investigational New Drug Annual Progress Report, Title 21, Part 312.32. Rockville, Maryland: *Food and Drug Administration, 1991: 95.*
- 33.- Lee, Chi Jen. Development and Evaluation of Drugs. From laboratory through Licensure to market. USA: *CRC Press, 1993: 21-45.*
- 34.- Yacobi, Avraham; Skelly, Jerome P., Shah, Vinod P., Benet, Leslie Z. Integration of Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Toxicokinetics in Rational Drug Development, New York: *Plenum Publishing Corporation, 1993: 23-31.*
- 35.- Albert, A., Serjeant, P. The Determination of Ionisation Constants. London: *Chapman and Hall, 1984: 2-12, 70-95.*
- 36.- James C., Kenneth. Solubility and related properties. Drug and Pharmaceutical Sciences vol. 28. USA: *Marcel Dekker Inc. 1986: 36-52.*
- 37.- Yalkowski, S. H., Valvoni, S. C. And Roseman, T. J. Solubility and Partitioning VI: Octanol Solubility and Octanol-Water Partition Coefficients. *J. Phar. Sci. 1983; 72 (8): 366-370.*
- 38.- Smidt, J.H. Offringa, J.C.A., Crommelin, D.J.A. Dissolution Rate of Griseofulvin in Bile Salt Solutions. *J. Pharm. Sci. 1991; 80 (4): 399-401.*
- 39.- Nielsen, L.S., Bundgaard, H. Falch, E. Prodrugs of thiabendazole with increased water-solubility. *Act. Pharm. Nord. 1992; 41 (1): 43-49.*
- 40.- United States Pharmacopoeia XXIII, The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, Md. **1994: 1929.**
- 41.- Shah, V. P., Midha, K.K., Dighe, S. McGilveray, I.J., Skelly, J.P., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C. T., Cook, C.E., McDowall, R.D., Pittman, K.A. and Spector, S. Analytical methods validation: Bioavailability, Bioequivalence and Pharmacokinetics studies. *J. Pharm. Sci. 1992; 81: 308-312.*
- 42.- Bresolle, F.M., Bromet-Petit and Audran, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J. Chromatogr. B. 1996; 686: 3-10.*
- 43.- Braggio, S., Barnaby, R.J., Grossi, P., Cugola, M. A, strategy for validation of bioanalytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal. 1996; 14: 375-388.*





- 44.- Korolkovas, Andrejus. Essentials of Molecular Pharmacology Background for Drug Desing. USA: *John Wiley and Sons Inc.*, 1970: 13-39.
- 45.- Hurtado, M, Medina, M.T., Sotelo, J., Jung, H. Sensitive high performance liquid chromatographic assay for albendazole and its main metabolite albendazole sulphoxide in plasma and cerebrospinal fluid. *J. Chrom.* 1989; 494: 403-407,.
- 46.- Henessy, D. Pharmacokinetic disposition of benzimidazoles drug in the ruminat gastrointestinal tract. *Parasitol. Today.* 1993; 9: 329-333.
- 47.- Ngmuo, A. J., Marriner, S. E., Bogan, J. A. The pharmacokinetic of fenbendazole and oxfenbendazole in cattle. *Vet. Res. Comm.*, 1984, 8, 187-193.
- 48.- Mariner, S. E., Morris, D. L., Dickson, B., Bogan, J. A. Pharmacokinetics of albendazol in man. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1986; 30: 705-708.
- 49.- Jung, H, Sánchez, M., González, A., Martínez, J.M., Suástegui, R., González-Esquivel, D. Clinical pharmacokinetics of albendazole in children with neurocysticercosis. *Am. J. Ther.* 1997; 4: 23-26.





Biotarma

Agradecimientos

El ser

*En la poesía de todos
está mi poema*

*El que la escribe
me escribe*

*porque el aroma
crea el gusto*

*Yo soy el aroma del cielo
para que gustes de él*

Un buen detalle lleva al cielo

*De una flor
arranqué un pétalo*

*del pétalo
saqué un perfume*

*del perfume.. ...una idea
de la idea
saqué una vivencia especial*

*con la vivencia
toqué el espíritu*

*y en el espíritu
llegue al reino*

*Todo.....
por una flor*

Con todo mi amor para mi madre en el cielo
y para mi padre aún conmigo.
Mamácata tu también estas presente.

*A Araceli, Janette, Dave y Edgar
que han pintado mi vida de ilusiones
por siempre juntos
Por nuestros más caros anhelos
Por ella.*

*A mis tías Emmita, Alba y Fide
con especial cariño a mi tía Emmita
gracias por tu compañía
y cariño inigualable.
A Papáteban.*

*Al clan del Rivero
Porque siempre han estado ahí.*

*Take my life
Take my dreams
Take my hand
Take my heart*

A mis guías en el camino de la ciencia:

Dra. Helgi Jung Cook, M. en C. Inés Fuentes Noriega,
M. en C. Dinora F. González, en su momento al M. en C. Juan Manuel
Rodríguez.

Al Dr. Castillo: el papá del α BIOF10, gracias por su confianza.
Alicia gracias mil por esos fines de semana dedicados al α BIOF10.

A los sinodales, por su entusiasta revisión y comentarios al presente
trabajo.

Al inútil mayor, Hugo como siempre el primero en todo. Te
extrañamos.

Eres mi mejor amigo.

A los inútiles: Tete, Aba, Morty, Lorna y Richard (nótese la simbiosis),
Enrique y Manolo. Yax y Euti. Somos fuertes y juntos todo lo
podemos. A los desertores del club.
Chela tu también eres medio inútil.

A mi güerita (Dea) aunque te encuentres lejos, sigues cerca de mí.
Estoy orgulloso de tí. Eres parte de mí.
Sigue como vas y veras
Rutger es chico para tí.

A mis amigos biofarmacéuticos: Helgi, Inés, las Margaritas, Dea,
Dinora, Nelly, Lulú, Liz, Luis, Manolo. Gracias por su hombro en esos
momentos, por ustedes estoy aquí sin duda (alguna).

Isabel Aguilar, es increíble tu buena onda. Nunca cambies.

Angela Sotelo realmente aprecio su amistad, gracias por considerarme
su amigo.

Luis, sin tu amistad me hubiera sido más difícil reconocer el camino.
Morty tu apoyo es inigualable.

Al Dr. Anatoli Iatsimirski, gracias por su apoyo en la parte
experimental. Su sencillez es extraordinaria.

Dr. Froylan Ibarra, su apoyo fue invaluable en la realización de este
proyecto.

A esa ilusiónsiempre viva.

**A Conacyt por la beca otorgada para la realización
de mis estudios de maestría y a la DGAPA
proyecto IN214496 por el apoyo en el presente
proyecto de investigación.**