

125



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

“Desarrollo y validación de un método
analítico por extracción líquido-líquido para
cuantificar prazicuantel en plasma”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

GLORIA KARINA RODRÍGUEZ VALERO



290085

MÉXICO, D.F., 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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	Q.F.B. Rosa Lorenia Mora-Tovar y Chávez
Vocal	Q.F.B. Ricardo Rodríguez Sáenz
Secretario	M. en C. Liz Jannet Medina Reyes
Primer suplente	M. en C. Juan Manuel Rodríguez
Segundo suplente	Q.F.B. Ma. De Los Dolores Campos Echeverría

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
LABORATORIO DE NEUROPSICOFARMACOLOGÍA,
INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y
NEUROCIRUGÍA “MANUEL VELASCO SUÁREZ”**

ASESOR:

M. en C. Liz Jannet Medina Reyes _____



SUSTENTANTE:

Gloria Karina Rodríguez Valero _____



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Desarrollo y validación de un método analítico por extracción líquido-líquido para cuantificar prazicuantel en plasma”

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

GLORIA KARINA RODRÍGUEZ VALERO

Porque este trabajo es suyo:

A mis papás, por el gran esfuerzo
que hicimos juntos, por su
constante sacrificio, por su ejemplo,
por sus regaños y apapachos, por
su infinito apoyo y amor y sobre
todo porque aún seguimos juntos
adelante. Muchas gracias.

A Karla por aguantarme 20 años y por los que le faltan. Por compartir conmigo momentos inolvidables y por ser mi hermana.

A mi Lela, porque tengo la fortuna de tener a la mejor abuela del mundo.

A mis tíos favoritos: Pablo, Paty Pacheco, por todas las clases particulares que me han dado y por toda la ayuda incondicional que he recibido de ustedes.
Gracias.

A mis tías latosas: Paty y Dulce Valero.

A mis primos: Nuri, Perla, Paola, Omar, Edgar y Pamela porque sé que siempre vamos a estar juntos.

A Rafael C. Porque siempre ha estado conmigo en todos los momentos más felices de mi vida pero también en los más amargos. Por su gran apoyo y ayuda, por su maravillosa compañía en los laboratorios, en la biblioteca y en los salones de clase. Por todo el cariño que he recibido. Gracias.



ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
II. GENERALIDADES	3
2.1 Neurocisticercosis	3
2.1.1 Clasificación	6
2.2.2 Cuadro clínico	8
2.1.3 Tratamiento	10
2.2 Praziquantel	12
2.2.1 Propiedades fisicoquímicas	13
2.2.2 Propiedades farmacológicas	15
2.2.3 Mecanismo de acción	16
2.2.4 Propiedades farmacocinéticas	20
2.2.4.1 Absorción	20
2.2.4.2 Distribución	21
2.2.4.3 Metabolismo	22
2.2.4.4 Biodisponibilidad	23
2.2.4.5 Interacciones farmacocinéticas	24
2.2.4.6 Eliminación	25
2.2.5 Toxicidad	26



2.3 Métodos para la cuantificación de PZQ en fluidos biológicos	27
2.3.1 Método fluorométrico	28
2.3.2 Cromatografía de gases	30
2.3.3 Método radiométrico	31
2.3.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	32
2.4 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución	34
2.4.1 Instrumental	34
2.4.2 Bombas	36
2.4.3 Inyectores	36
2.4.4 Detectores	38
2.4.5 Fase móvil	41
2.4.6 Columnas y fases estacionarias	42
2.5 Validación de métodos bioanalíticos	45
2.5.1 Linealidad	46
2.5.2 Precisión	48
2.5.3 Exactitud	50
2.5.4 Límite de cuantificación	51
2.5.5 Límite de detección	51
2.5.6 Selectividad	52
2.5.7 Recuperación relativa	52
2.5.8 Estabilidad de la muestra analítica	52

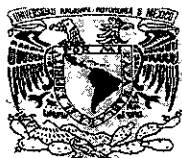


III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Método analítico para la cuantificación de PZQ en plasma	53
3.1.1 Material, equipo e instrumentos	53
3.1.2 Reactivos y sustancias de referencia	54
3.1.3 Preparación de las soluciones	55
3.1.4 Método de extracción	57
3.2 Validación del sistema	60
3.2.1 Linealidad	60
3.3 Validación del método	61
3.3.1 Linealidad	61
3.3.2 Precisión	61
3.3.2.1 Repetibilidad	61
3.3.2.2 Reproducibilidad	62
3.3.3 Exactitud	62
3.3.4 Límite de cuantificación	63
3.3.5 Límite de detección	63
3.3.6 Selectividad	63
3.3.7 Recuperación relativa	64
3.3.8 Estabilidad de la muestra analítica	64
3.4 Estudio farmacocinético en voluntarios sanos	65



IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	
4.1 Validación del sistema	68
4.1.1 Linealidad	68
4.2 Validación del método	70
4.2.1 Linealidad	70
4.2.2 Precisión	72
4.2.2.1 Repetibilidad	72
4.4.2.2 Reproducibilidad	74
4.2.3 Exactitud	76
4.2.4 Límite de cuantificación	77
4.2.5 Límite de detección	78
4.2.6 Selectividad	78
4.2.7 Recuperación relativa	81
4.2.8 Estabilidad de la muestra analítica	82
4.3 Estudio farmacocinético en voluntarios sanos	86
V. CONCLUSIONES	95
	97
VI. BIBLIOGRAFÍA	



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de la curva de calibración de prazicuantel en plasma o en acetona.	56
Tabla 2. Linealidad del método analítico para la cuantificación de prazicuantel en plasma.	72
Tabla 3. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de prazicuantel en plasma.	73
Tabla 4. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de prazicuantel en plasma.	75
Tabla 5. Exactitud del método para cuantificar prazicuantel en plasma.	76
Tabla 6. Límite de cuantificación.	77
Tabla 7. Recuperación relativa de prazicuantel.	81
Tabla 8. Estabilidad de las muestras en refrigeración.	83
Tabla 9. Estabilidad de las muestras en congelación.	85
Tabla 10. Análisis de los puntos de control de calidad.	88
Tabla 11. Concentraciones plasmáticas de prazicuantel correspondientes al voluntario 1.	89
Tabla 12. Concentraciones plasmáticas de prazicuantel correspondientes al voluntario 2.	91
Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos. Voluntarios 1 y 2.	93



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del prazicuantel.	13
Figura 2. Diagrama para la extracción de prazicuantel en plasma.	59
Figura 3. Linealidad del sistema para la cuantificación de prazicuantel en acetona.	69
Figura 4. Linealidad del método analítico para la cuantificación de prazicuantel en plasma.	71
Figura 5. Muestra de plasma	79
Figura 6. Muestra de plasma adicionada con ranitidina, cafeína, carbamazepina y fenitoína.	79
Figura 7. Muestra de prazicuantel en plasma adicionada con estándar interno.	80
Figura 8. Muestra de prazicuantel en plasma adicionada con cafeína, ranitidina, carbamazepina, fenitoína y estándar interno.	80
Figura 9. Curva de calibración para el análisis de las muestras de los voluntarios 1 y 2.	87
Figura 10. Gráfica de niveles plasmáticos de prazicuantel. Voluntario 1.	90
Figura 11. Gráfica de niveles plasmáticos de prazicuantel. Voluntario 2.	92



I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La cisticercosis es una enfermedad provocada por la presencia en el organismo de *Cysticercus cellulosae* y *Cysticercus racemosus*, formas larvarias de la *Taenia solium*, gusano parásito del intestino del hombre. Es la enfermedad más común del Sistema Nervioso Central por lo que es considerada un problema médico, veterinario y de salud pública, principalmente en México y en otros países en desarrollo, así como en aquellas naciones industrializadas con gran afluencia de inmigrantes, en donde su incidencia es alta y principalmente relacionada a factores económicos y socioculturales.

El prazicuantel es efectivo en gran variedad de infecciones parasitarias, incluyendo la esquistosomiasis y helmintiasis. El empleo de prazicuantel en el tratamiento de las helmintiasis ha sido uno de los mayores logros en salud a nivel mundial ya que numerosas parasitosis consideradas en el pasado como no tratables, en la actualidad lo son. En países subdesarrollados es muy útil, ya que las infecciones por céstodos en animales, también causan una pérdida económica importante.

A pesar de su amplio uso existe relativamente poca información acerca de su farmacocinética, biodisponibilidad y metabolismo, así como de métodos analíticos confiables para cuantificar este fármaco en fluidos



biológicos. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”, se realizan actualmente trabajos de investigación enfocados a mejorar el régimen de dosificación del prazicuantel (PZQ) en pacientes con neurocisticercosis, analizándose un gran número de muestras en cada estudio. El método analítico comúnmente empleado para la cuantificación del PZQ en fluidos biológicos, se basa en una extracción sólido-líquido la cual resulta muy costosa por el uso de cartuchos de extracción.

De acuerdo a lo anterior, se requería de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución más económico, por lo que se realizó el presente trabajo con los siguientes objetivos:

1. Desarrollar un método analítico por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, para la cuantificación de prazicuantel en plasma, empleando una extracción líquido-líquido.
2. Validar el método desarrollado de acuerdo a los criterios de aceptación de la NOM177SSA-1-1998.
3. Emplear el método validado para cuantificar los niveles plasmáticos de prazicuantel en muestras de voluntarios sanos.



II. GENERALIDADES

2.1 NEUROCISTICERCOSIS

La neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad que se produce cuando el hombre se convierte en huésped intermediario del céstodo *Taenia solium* al infestarse con su forma larvaria denominada cisticerco. (1)

La neurocisticercosis es conocida desde los tiempos de Aristóteles como una enfermedad del cerdo; sin embargo, no es sino hasta el siglo XVII cuando se identificaron vesículas redondas y llenas de líquido, en el cuerpo calloso de un individuo que falleció a consecuencia de un evento vascular cerebral, a las cuales Laennec denominó cisticercos, nombre que deriva de las raíces griegas "kistic" y "kerkos" que significan quiste y cola, respectivamente. A mediados del siglo XIX, varios investigadores alemanes demostraron la asociación entre cisticerco y *Taenia solium*, estableciendo en



forma definitiva que los primeros representan la forma larvaria del céstodo adulto (1,2).

La frecuencia de la NCC es muy alta y está íntimamente relacionada con factores económicos y socioculturales. En Europa la NCC fue endémica en los años de la pre-guerra y posterior al regreso masivo de soldados provenientes de la India, sin embargo, las medidas sanitarias que se implementaron, redujeron en forma progresiva su frecuencia hasta prácticamente eliminarla en la actualidad (1).

La NCC es una enfermedad pleomórfica que puede causar síndromes neurológicos y lesiones patológicas graves. En la forma usual de transmisión, el ser humano porta en el intestino la *Taenia solium*, conocida como "solitaria" y es el único huésped definitivo del céstodo, el cual se adquiere al ingerir carne de cerdo mal cocida, infestada con cisticercos. La *Taenia adulta* elimina diariamente proglótides grávidos que contienen aproximadamente cincuenta mil huevecillos cada uno, los cuales contaminan al cerdo y cuando éste es alimentado con excretas humanas, desarrolla cisticercosis muscular y cerebral. Cuando el hombre ingiere alimentos



contaminados con huevecillos de *Taenia solium*, se convierte también en huésped intermediario en el ciclo biológico de dicho céstodo y desarrolla cisticercosis (1,3).

Existen dos vías principales por las que el hombre adquiere cisticercosis; la ingesta de alimentos contaminados y, a través de la vía ano-mano-boca, en individuos portadores del parásito adulto en su intestino (1).

Una vez ingeridos, los huevecillos de *Taenia solium* entran en contacto con el jugo gástrico y se libera el embrión hexacanto, el cual atraviesa la pared intestinal y llega a la circulación sistémica donde se transporta a los tejidos del huésped. A nivel tisular el embrión se rodea de una membrana transformándose en el metacéstodo de la *Taenia solium*, también llamado cisticerco (4).

La *Taenia solium* adulta está constituida por una cabeza (escólex) que presenta cuatro ventosas y una doble corona de ganchos, un cuello angosto y un cuerpo (estróbila) formado por cientos de proglótides hermafroditas. El cisticerco está compuesto por una membrana que consta de tres partes:



cuticular externa, celular media y reticular interna. En las vesículas se observa el escólex invaginado, el cual presenta una estructura similar a la *Taenia solium* adulta, pero existe otra forma microscópica de cisticerco en la que no se identifica el escólex, esta forma está compuesta por varias membranas adheridas una a otra y se encuentra frecuentemente en las meninges basales, aparentemente en estos casos, el escólex ha desaparecido a consecuencia de un proceso degenerativo (5,6).

2.1.1 CLASIFICACIÓN DE LA NEUROCISTICERCOSIS.

El gran pleomorfismo clínico de la NCC, ha dificultado los intentos de clasificar dicha entidad con finalidad pronóstica o terapéutica. Para que sea de utilidad terapéutica, la clasificación de NCC debe considerar tanto la localización anatómica de las lesiones, como el grado de actividad de la enfermedad, representado por la presencia o no de respuesta inmune del huésped contra el parásito. La clasificación en formas activas e inactivas según Sotelo, et. al (7) basada en un estudio de 753 pacientes con NCC es la más adecuada, ya que considera la localización de las lesiones y el grado



de actividad, además de que facilita el diagnóstico y permite un abordaje terapéutico racional para cada una de las formas clínicas. La clasificación de acuerdo a Sotelo se presenta a continuación:

- FORMAS ACTIVAS DE LA NEUROCISTICERCOSIS (6,7)

Aracnoiditis

Hidrocefalia secundaria a inflamación meníngea

Quistes parenquimatosos

Infarto cerebral secundario a vasculitis

Efecto de masa secundario a quistes gigantes

Quistes intraventriculares

Quistes espinales

- FORMAS INACTIVAS DE NEUROCISTICERCOSIS (6,7)

Calcificaciones

Hidrocefalia secundaria a fibrosis meníngea



2.1.2 CUADRO CLÍNICO

Las manifestaciones clínicas de la NCC son muy variadas y dependen en gran parte de la localización y número de las lesiones, así como del grado de respuesta inflamatoria del huésped a la presencia del parásito en el sistema nervioso. Los cisticercos pueden localizarse a nivel del parénquima cerebral, espacio subaracnoideo, sistema ventricular o médula espinal (3).

La NCC parenquimatosa suele presentar manifestaciones que incluyen cefalea, crisis convulsivas, signos neurológicos focales y deterioro intelectual progresivo (6).

La NCC meníngea a menudo se manifiesta clínicamente por hipertensión endocraneal secundaria a hidrocefalia por obstrucción de los agujeros de Luschka y Magendie, debido a un proceso de aracnoiditis activa o fibrosis; otras manifestaciones incluyen infartos cerebrales como consecuencia de la oclusión de vasos de pequeño y mediano calibre afectados por endarteritis, atrofia óptica o defectos campimétricos, debido a aracnoiditis optoquiásmática o quistes en región selar (6).



El sistema ventricular puede afectarse por dos tipos de lesiones, una de ellas son los quistes intraventriculares que se localizan de preferencia en el IV ventrículo o en los ventrículos laterales, el otro tipo de lesión es la ependimitis granular del acueducto de Silvio o del agujero de Monro. En ambos casos las manifestaciones clínicas son la hipertensión endocraneal secundaria a hidrocefalia obstructiva (6).

La NCC espinal es poco frecuente y sus manifestaciones clínicas son de igual manera inespecíficas, simulando en ocasiones tumores medulares, procesos heredo-degenerativos u otras patologías inflamatorias de la médula espinal (1).



2.1.3 TRATAMIENTO DE LA NEUROCISTICERCOSIS

Debido al pleomorfismo de la neurocisticercosis y al curso que esta enfermedad sigue en cada paciente, es necesario individualizar el tratamiento, de acuerdo al diagnóstico establecido. Como regla general, existen dos parámetros que determinan el abordaje terapéutico: la actividad de la enfermedad y la localización de las lesiones (8).

Los pacientes que únicamente presenten calcificaciones como evidencia de la NCC no deben recibir tratamiento específico, ya que éste es una secuela inactiva de la enfermedad. Pero cuando estas calcificaciones se manifiestan clínicamente como crisis convulsivas, se debe dar tratamiento con antiepilépticos. Los pacientes con evidencia de quistes parenquimatosos viables que encuentran tolerancia inmunológica del huésped son los más beneficiados con el tratamiento anticisticercoso específico y deben recibir una terapia con praziquantel o albendazol (6).



Los pacientes con NCC subaracnoidea activa que presentan hidrocefalia, requieren como primera medida la implantación de una válvula de derivación ventricular, luego se puede dar tratamiento con prazicuantel o albendazol. Aunque la eficacia de dichos fármacos en la NCC menígea es menor que en la forma parenquimatosa, se ha demostrado la remisión de alteraciones citoquímicas en LCR, compatible con la remisión de la enfermedad, pero aquellos pacientes con fibrosis menígea crónica secundaria a NCC no se benefician con fármacos anticisticercosos, por lo que en estos pacientes se aconsejan medidas paliativas de acuerdo a sus manifestaciones clínicas (1).

En la NCC intraventricular cuando hay presencia de quistes intraventriculares, éstos son resistentes al tratamiento anticisticercoso, por lo tanto la medida terapéutica en estos casos es la extirpación quirúrgica de la lesión (1).

El tratamiento de la NCC espinal depende de la topografía y la actividad de la enfermedad, en los casos de la forma leptomenígea activa, se recomienda el uso de fármacos anticisticercosos, pero si el tratamiento no



es satisfactorio o hay la presencia de un quiste único, se puede intentar la resección quirúrgica de la lesión mediante laminectomía (1).

Existen casos de pacientes que presentan formas mixtas de la NCC, en los que el tratamiento debe ser iniciado de acuerdo a las prioridades que se presenten (1).

2.2 PRAZICUANTEL.

El praziquantel es un derivado de la pirazinoisoquinolina, clínicamente efectivo contra un amplio espectro de infecciones causadas por céstodos y tremátodos en el hombre y en los animales, que ha sido usado desde 1980, observando una respuesta benéfica en el tratamiento de la cisticercosis humana. Su uso tiene mayor proyección en países subdesarrollados, en donde observamos un alto número de incidencia de las enfermedades parasitarias. En México se han llevado a cabo investigaciones para optimizar el tratamiento de la NCC con prazicuantel, con la finalidad de reducir los costos por el uso prolongado de este fármaco y para hacer más efectivo el tratamiento (3).



2.2.1 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS.

- Nombre químico: 2-(Ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino'(2,1-a)isoquinolein-4-ona (9).
- Nombres comerciales: Cesol, Cisticid, Ehiliten (10).
- Fórmula condensada: $C_{19}H_{24}N_2O_2$ (11).
- Fórmula desarrollada (11):

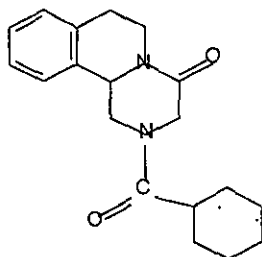


Figura 1. Estructura química del prazicantel.



- Masa molecular: 312.41 g/mol (9).
- Apariencia física: compuesto cristalino incoloro, casi inodoro, de sabor amargo (9,12).
- Estabilidad: estable bajo condiciones normales e higroscópico. Inestable a la luz. En soluciones neutras o débilmente ácidas o alcalinas, la concentración de PZQ disminuye en una proporción menor al 2%, durante 16 h, a temperatura ambiente. El PZQ puede sufrir hidrólisis en medio fuertemente alcalino (13).
- Solubilidad: soluble en la mayoría de los solventes orgánicos (9.7 g/100 ml de etanol; 56.7 g/100 ml de cloroformo a 25°C); soluble en dimetilsulfóxido. En agua presenta una solubilidad de 0.04 g por cada 100 ml a 25 °C (13).
- Punto de fusión: 136°-139°C (9).
- Coeficiente de partición: en una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos (pH=7.0) y ciclohexano, se obtuvo un valor de 14:86. Para la misma solución amortiguadora y n-hexano, el valor fue de 38:62 (12).



2.2.2 PROPIEDADES FARMACOLÓGICAS

Las pirazinoisoquinolinas fueron inicialmente empleadas con un fin terapéutico totalmente diferente. A inicios de los años 70's se hizo necesaria la búsqueda de agentes tranquilizantes efectivos con menores efectos adversos. Las pirazinoisoquinolinas prometían ser moléculas efectivas, bien toleradas como agentes tranquilizantes. Sin embargo, se demostró que se necesitaba emplear altas dosis para alcanzar un efecto comparable con los agentes tranquilizantes que se utilizaban en aquellos momentos. Posteriormente, se determinaron sus propiedades antihelmínticas en tremátodos y céstodos pero se limitaba a uso veterinario. Finalmente el tratamiento de animales infectados señaló un primer paso hacia el estudio en el tratamiento de infecciones antihelmínticas en seres humanos (14,15).

El PZQ se clasifica como un antihelmíntico de amplio espectro contra todas las especies *Schistosoma*, parásitos que infectan al hombre, además de otras especies de tremátodos y céstodos, por el contrario, este compuesto prácticamente no afecta los nemátodos parásitos. Se ha empleado desde



1980 en el tratamiento de la cisticercosis humana. Dosis únicas de PZQ (10 mg/kg) erradican la taeniasis intestinal y administrándolo durante 3 a 6 días (25 a 50 mg/kg/día) erradican la cisticercosis subcutánea y sólo el isómero(-) es responsable de la mayor parte de la actividad antihelmíntica (16, 17, 18).

2.2.3 MECANISMO DE ACCIÓN DEL PRAZICUANTEL

In vitro, el PZQ es absorbido en forma rápida y reversible pero no es metabolizado por los helmintos. El mecanismo de acción del PZQ está asociado con diversos efectos que ocurren en los parásitos. Uno de ellos es la contracción o parálisis muscular acompañada de un daño al tegumento, éstos parecen ser los efectos primarios del fármaco, los cuales se generan por cambios en el flujo de cationes divalentes, particularmente calcio, el cual incrementa la permeabilidad de la membrana. Posteriormente ocurre una extensa vacuolización, vesiculación y degeneración del tegumento de los parásitos susceptibles (19,20).

El PZQ induce un flujo de iones calcio a través del tegumento, lo cual se piensa que es vital para producir la contracción muscular, ya que dicho



tegumento está eléctricamente acoplado a las células musculares, por lo que un aumento intrategumental de calcio, conduce a un incremento de calcio en el retículo sarcoplásmico, generando a su vez una contracción. Esto quedó demostrado cuando se empleaban medios libres de calcio, observándose que se bloqueaba la contracción inducida por el prazicuantel (20).

Las investigaciones sobre el mecanismo de acción por el cual el PZQ produce una contracción tónica y una subsecuente parálisis flácida de *S. mansoni* en un medio conteniendo una proporción elevada de calcio y magnesio, muestran que la parálisis flácida se produce por la reducción de la habilidad del parásito para la toma de calcio. El retiro de calcio o la adición de magnesio al medio de incubación bloquea la acción de PZQ. Lo anterior sugiere que el efecto antihelmíntico del PZQ sobre *S. mansoni* es debido al influjo de calcio a las células nucleares, el cual interactúa con sitios específicos en el tegumento de la membrana sarcoplásmica del parásito y por tanto, en presencia de proporciones elevadas de magnesio estos sitios son bloqueados por magnesio, convirtiendo la contracción tónica en una parálisis flácida. En céstodos, el mecanismo es diferente, ya que aún cuando exista la



disminución de calcio o incremento de magnesio se presenta la contracción muscular (21).

La relación entre el prazicuantel y el flujo de iones calcio, sugiere que los sitios de acción son canales iónicos permeables al calcio que se encuentran en las membranas del tegumento y las células musculares. El flujo de iones calcio puede ser bloqueado por magnesio o lantano, pero no por níquel o cobalto. Además estos canales deben ser farmacológicamente distintos a los canales de calcio del huésped, de otra manera el prazicuantel resultaría tóxico para el huésped y no sería terapéuticamente efectivo (21).

Se ha demostrado que el sistema inmune del huésped juega un papel importante en la muerte del parásito inducida por el prazicuantel. El daño producido por la acción del prazicuantel sobre esquistosomas, da como resultado la exposición de antígenos sobre la superficie del tegumento dañado y éstos son potenciales para el ataque del sistema inmune del huésped parasitado (18).



Existe adicionalmente otra teoría que sugiere que el PZQ altera la homeostasis del calcio por interacción de fosfolípidos de membrana. El PZQ puede, en presencia de calcio, aumentar la transición de la bicapa lipídica no permeable a una estructura de empaquetamiento hexagonal, la cual no presenta una barrera funcional en la permeabilidad de iones. El PZQ puede desestabilizar las membranas lipídicas, modificando su organización simplemente insertándose en un espacio de la membrana (19).

Además de lo anteriormente mencionado, existen otros efectos del prazicuantel que a menudo están asociados con sus efectos primarios. Estos fenómenos secundarios incluyen cambios en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y nucleótidos, además de un decremento en las actividades enzimáticas y cambios en las propiedades superficiales de las membranas. Estos efectos se refieren a una disminución del consumo de glucosa, disminución en la liberación de lactato, contenido de glucógeno y ATP (19,20).



2.2.4 PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS

2.2.4.1 ABSORCIÓN

El PZQ es absorbido rápida y completamente en el tracto gastrointestinal, después de una administración oral. Las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan de 1.5 a 2 horas después de su administración en dosis de 6.25 a 50 mg/kg, considerando las variaciones entre cada individuo debido a las diferencias en el metabolismo. En sujetos sanos, la absorción de prazicuantel es del 80% de la dosis administrada pero debido a la elevada liposolubilidad del PZQ y a sus características cinéticas, se origina una considerable disminución de la concentración de prazicuantel en plasma después de 4 horas de la administración. Al cuadruplicar la dosis oral, los niveles en plasma se incrementan 8 veces, indicando una saturación hepática (21,22).



2.2.4.2 DISTRIBUCIÓN

El PZQ es rápidamente distribuido en los tejidos corporales debido a su alta liposolubilidad. Aproximadamente entre 80 y 85% del fármaco se une a proteínas plasmáticas. Steinar et. al.(23) han estudiado la distribución del prazicuantel en ratas, administrando intravenosa y oralmente una dosis de PZQ marcado radioactivamente. Los autores determinaron que el prazicuantel no se acumula en ningún órgano específico debido a su corto tiempo de vida media y su rápida velocidad de eliminación. Así mismo, encontraron altas concentraciones de ^{14}C -radioactivo en hígado y riñón por la alta afinidad del PZQ hacia estos dos órganos excretores, enfatizando su importancia en la eliminación renal y biliar, así como el metabolismo del PZQ. Adicionalmente, determinaron concentraciones menores en otros órganos y tejidos como el estómago, intestino delgado e intestino grueso, glándulas adrenales, ovario y útero, así como en pulmón, páncreas y glándula tiroides. En cerebro, sólo encontraron aproximadamente entre 1/3 y 1/8 del fármaco, comparado con las concentraciones obtenidas en plasma. Las concentraciones de prazicuantel en la leche materna alcanzan cerca del 25% de las concentraciones plasmáticas (23).



Se ha determinado que el PZQ no metabolizado es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que explica su eficacia en la cisticercosis parenquimatosa (23).

2.2.4.3 METABOLISMO

En humanos, el PZQ sufre un extenso efecto de primer paso hepático, biotransformándose a series de productos mono y dihidroxilados, los cuales presentan menor actividad antihelmíntica. El principal metabolito hidroxilado en plasma se ha identificado como 4-hidroxiciclohexil-carbonil. El primer paso metabólico depende de la dosis administrada. Leopold y cols. (22), observaron que el efecto del primer paso metabólico alcanza una saturación a concentraciones plasmáticas dentro del intervalo de 0.64 a 3.2 mmol/L (24).

En estudios realizados en ratas, Masimirembwa y cols. (25) demostraron que la difenilhidramina, cimetidina y 17α -etinilestradiol, inhiben significativamente la hidroxilación del prazicuantel. La



difenilhidramina es un inhibidor específico del citocromo P450 2B1, mientras que la cimetidina y el 17α -etinilestradiol son inhibidores de las isoformas 3A del citocromo P450. La inhibición significativa de dicha hidroxilación del prazicuantel por estos compuestos, sugiere la participación de las isoformas 2B y 3A del citocromo P450 en el metabolismo del prazicuantel. Además, la teoría de que el prazicuantel es metabolizado por estas isoformas, pueden explicar la disminución de la biodisponibilidad del PZQ y de los niveles plasmáticos en ratas que han sido tratados con fenobarbital, compuesto que induce la actividad microsomal hepática (25).

2.2.4.4 BIODISPONIBILIDAD

Debido a que no existen formulaciones parenterales del PZQ, solamente se ha determinado la biodisponibilidad relativa del PZQ en humanos. Aún así, estudios en animales sugieren que ocurre un extenso efecto de primer paso metabólico y sólo una pequeña proporción del fármaco activo es capaz de alcanzar la circulación sistémica. En un estudio cruzado, Mandour y cols (26) compararon dos preparaciones comerciales equivalentes de PZQ en voluntarios sanos de origen sudanés, los cuales



recibieron dosis orales únicas de 40 mg/kg. Se encontraron diferencias significativas entre los productos, respecto a las concentraciones plasmáticas máximas alcanzadas pero no hubo diferencia en el área bajo la curva encontrada (26).

2.2.4.5 INTERACCIONES FARMACOCINÉTICAS

Las concentraciones plasmáticas de PZQ incrementan cuando se administra una dieta rica en carbohidratos, aparentemente debido a la inhibición del citocromo P450, el cual participa en las reacciones de oxidación responsables del metabolismo oxidativo del PZQ. Bittencourt y cols. (24) estudiaron la influencia de antiepilépticos como la carbamazepina y la fenitoína (potentes inductores enzimáticos), en el metabolismo del PZQ. Dichos estudios demostraron que ambos fármacos reducen la biodisponibilidad del prazicuantel cuando se administra oralmente, sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre, todavía no está aclarado. Los autores recomiendan que los pacientes no ingieran otros fármacos que induzcan el sistema hepático microsomal. Adicionalmente, se ha demostrado que las concentraciones plasmáticas de prazicuantel disminuyen



considerablemente con la administración simultánea de dexametasona y aumentan con la administración de cimetidina. Por tales motivos, se ha sugerido que los corticoesteroides se empleen sólo en un tratamiento de las reacciones adversas de la respuesta inflamatoria secundaria debida a la destrucción de los parásitos y no como una terapia preventiva (27, 28).

2.2.4.6 ELIMINACIÓN

El PZQ así como sus metabolitos, se eliminan rápidamente por vía renal, en ratas, perros, monos y humanos, ajustándose a un modelo abierto de un compartimento después de una administración de primer orden. Aproximadamente el 80% de una dosis del fármaco se recupera en la orina como metabolitos después de 4 h. La vida media aparente de eliminación de los metabolitos es de aproximadamente de 4 h y la del prazicuantel inalterado es de 1.5 a 2 horas, demostrando que cuando el prazicuantel es captado rápidamente por los tejidos, su eliminación es muy rápida (30, 31).



2.2.5 TOXICIDAD

El PZQ es bien tolerado por humanos y no ha presentado ninguna toxicidad a largo plazo en estudios realizados. En pacientes con NCC activa se ha demostrado que las principales complicaciones secundarias debidas al tratamiento con PZQ son el resultado de la destrucción de los cisticercos, lo cual es seguido de una liberación de antígenos, provocando entonces un proceso inflamatorio y edema. En pacientes hospitalizados, el empleo del PZQ se ha asociado con disturbios gastrointestinales y dolores transitorios de cabeza, los cuales aparecen 1 o 2 días después del inicio de la terapia. Estas complicaciones son controladas eficientemente con la adición de corticoesteroides a la terapia cisticida. Otras reacciones adversas incluyen náuseas, mareos y anorexia. Estos disturbios desaparecen rápidamente terminado el tratamiento. Adicionalmente este fármaco no es recomendado para mujeres embarazadas o en período de lactancia (16, 21).

Se han observado efectos poco usuales en pacientes con deficiencia de glucosa-6-fosfato hidrogenasa o pacientes con hemoglobinopatías (16).



La LD_{50} para una administración oral en ratones es de 2454 mg/kg. La toxicología de la reproducción indica que el PZQ no influye en la fertilidad de ratas hembras o macho. Aún durante la fase organogénica, cuando se administra oralmente PZQ, éste no tiene efecto embriotóxico o teratogénico sobre los animales tratados (29).

2.3 MÉTODOS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PRAZICUANTEL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS.

Existen muy pocos métodos reportados para la cuantificación de prazicuantel en fluidos biológicos. Estos métodos actualmente son poco empleados porque requieren de tiempo prolongado para realizar el análisis, tienen baja sensibilidad y son costosos. Sin embargo, a continuación se describen, en forma general, los métodos que han sido reportados en la literatura desde 1979 hasta la fecha.



2.3.1 MÉTODO FLUOROMÉTRICO.

Este método fue reportado por Putter, J. (32) en 1979 para la cuantificación de prazicuantel en plasma y orina. El método emplea 5 mL del fluido biológico, al cual se le agrega KOH 0.1 N. Se realiza una extracción líquido-líquido, empleando como disolventes una mezcla de benceno-n-hexano. Las muestras se agitan y se centrifugan. La fase orgánica se separa y se evapora a un volumen de 5 mL. Se añaden 0.5 mL de KOH 0.03 N y 0.5 mL de HCl 0.03 N, se agita y la fase orgánica se transfiere a otro tubo, al cual se le agrega KOH 0.1 N y se calienta a 80°C por 2 horas. El hidrolizado se lava con ciclohexano. Posteriormente, a 1 mL del hidrolizado se le adiciona una mezcla de H₃PO₄ 0.1 M y H₃BO₃ 0.1 M y una solución de cloruro de dansilo en acetona, se calienta durante 1 h a 40°C y se ajusta el pH a 13. El exceso de cloruro de dansilo se hidroliza dejando reposar la solución durante 20 min. a temperatura ambiente. Se lava con ciclohexano y se realiza una última extracción con 3 mL de una mezcla de ciclohexano-éter butílico, la cual se lava con H₃PO₄. Las muestras se dejan reposar durante una hora, para posteriormente llevar a cabo la medición fluorométrica a una longitud de onda de excitación de 346 nm y una



longitud de onda de emisión de 460 nm. El límite de detección es de 3 $\mu\text{g/mL}$ en plasma y 30 $\mu\text{g/mL}$ en orina (32).

El método fluorométrico puede llevarse a cabo en la mayoría de los laboratorios y requiere sólo de un fluorómetro disponible. La desventaja es que se encuentran valores de concentración más alta que los obtenidos por cromatografía de gases, ya que este método no distingue entre el fármaco inalterado y sus metabolitos, contribuyendo estos últimos a la fluorescencia medida. Este método a pesar de ser muy sensible, tiene los inconvenientes de requerir de una técnica muy complicada y laboriosa, de tiempos prolongados para realizar el análisis y costos altos para el laboratorio.



2.3.2 CROMATOGRAFÍA DE GASES.

Desarrollado en 1979 por Diekmann, H.W. (33), éste es un método para la determinación cuantitativa de prazicuantel en fluidos biológicos, principalmente en plasma, orina y heces fecales.

El método emplea 0.5 mL de fluido biológico, al cual se le añaden solución de NaOH y estándar interno. Se realiza una extracción líquido-líquido con una mezcla de acetato de etilo-éter diisopropílico, agitando durante 10 minutos. La fase orgánica se separa y se lava con una solución amortiguadora de fosfatos pH=6. Después de secar la solución sobre una mezcla de sulfato de sodio-carbonato de sodio, se evapora a sequedad y se reconstituye con acetato de metilo para posteriormente ser inyectada en el sistema cromatográfico. El límite de detección en plasma es alrededor de 0.01 $\mu\text{g/mL}$ y la desviación estándar relativa para las concentraciones en plasma de 0.1 $\mu\text{g/mL}$ de 4.5% (33).

El método de cromatografía de gases es el método más específico después de CLAR para determinar el fármaco no metabolizado, ya que



permite una completa separación de los metabolitos. Sin embargo, este método requiere un equipo más sofisticado que generalmente no está disponible en los laboratorios.

2.3.3 MÉTODO RADIOMÉTRICO

Para determinar la radioactividad específica del prazicuantel en órganos y fluidos biológicos, se emplea la molécula del fármaco marcado con ^{14}C (33,34).

A un volumen de 0.5 mL de la muestra biológica, se le añade una solución de centelleo que contiene butil-PBD en tolueno/dioxano/etanol. Posteriormente, para cuantificar, se emplean equipos de contadores de centelleo como el Nuclear Chicago o Packard Bell (30).

Este método es muy sensible pero no es específico, ya que no diferencia al prazicuantel inalterado de sus metabolitos. El método radiométrico tiene mayores aplicaciones en estudios de balance, pues permite obtener información del material no metabolizado que ha sido



excretado. Combinado con otros métodos específicos, este método puede proporcionar información del grado de metabolismo del fármaco.

2.3.4 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

En 1983, Xiao, SH. y cols. (35) desarrollaron un método para la determinación de prazicuantel en plasma. La técnica emplea 1 mL de plasma al cual se le añade estándar interno. La muestra se extrae con tres porciones de acetato de etilo saturado con agua y se centrifuga. Las tres porciones de acetato de etilo se combinan, se evaporan a sequedad y se reconstituye en una mezcla de acetonitrilo-agua, la cual se inyecta en el cromatógrafo bajo las siguientes condiciones: columna de 10 cm x 4.6 mm de DI, de gel de sílica octadecil RP-18, 5 micras; fase móvil: acetonitrilo-agua (38:62); flujo: 1.5 mL/min; detector: UV de longitud de onda variable a 210 nm. El método tiene un límite de detección de 2.5 ng/mL y un coeficiente de variación de 2.6%.

González-Esquivel et. all (36), desarrollaron un método para la cuantificación de prazicuantel en plasma y orina que emplea una extracción



sólido-líquido y requiere 2 mL de muestra, la cual se alcaliniza con NaOH. La muestra se pasa por un cartucho sep-pak previamente activado y se lava con solución amortiguadora de fosfatos pH=5, posteriormente se eluye con una mezcla de acetato de etilo/éter isopropílico y se seca con sulfato de sodio anhidro. Se evapora a sequedad en baño maría bajo corriente de nitrógeno, el residuo se reconstituye con fase móvil y se inyecta en el cromatógrafo bajo las siguientes condiciones: columna: C₁₈ ODS con tamaño de partícula de 5 μ . 250x4.6 mm DI; fase móvil: acetonitrilo:agua (45:55); flujo: 1.5 mL/min; sensibilidad del detector: 0.005 AUF y longitud de onda: 217 nm.

Con este método se obtiene un límite de detección tanto para orina como para plasma de 31.2 ng/mL, pero presenta la desventaja de que los costos del análisis empleando una extracción sólido-líquido son muy elevados, en comparación con una técnica de extracción líquido-líquido.



2.4 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

Según define la IUPAC, “La Cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una muestra, en la cual éstos se distribuyen en dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra se mueve. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película. La fase móvil puede ser líquida o gaseosa” (37).

2.4.1 INSTRUMENTAL

La cromatografía líquida es en esencia, como todos los métodos cromatográficos, un método separativo. Así, el lugar en donde se produce la separación, la columna, puede considerarse el corazón del sistema cromatográfico, alrededor de la cual se monta un equipo de mayor o menor complejidad. En el caso más simple, el cromatógrafo líquido estará constituido por (37):



- Un reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
- Un sistema que permite la introducción de la muestra: el inyector.
- Un sistema para forzar el pasaje de la muestra y la fase móvil a través de la columna: la bomba.
- Un sistema de monitoreo de la solución que emerge de la columna: el detector.
- Un sistema de registro de los datos provenientes del detector. La señal del detector siempre es analógica y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o por un integrador, o digitalizada para que pueda ser interpretada y procesada por una computadora.

Como resultado del análisis cromatográfico se obtienen dos productos:

- Uno gráfico, el cromatograma, que relaciona la concentración de soluto en función del tiempo de elución.
- Un eluido o eluato, el fluido proveniente de la columna que, de recolectarse en forma secuencial o escalonada (manualmente o con un colector de fracciones), contiene la fase móvil e idealmente, los componentes de la muestra separados.



2.4.2 BOMBAS.

Las bombas de CLAR impulsan a la fase móvil proveniente del reservorio de solvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna. Su caudal de trabajo puede ser muy variable, según la escala de trabajo escogida. Básicamente existen dos tipos de bomba: las de pistón (bombas reciprocantes) y las de desplazamiento continuo (bombas jeringa) (37).

Las bombas están construidas de materiales muy resistentes tanto al ataque químico como al desgaste mecánico. Los componentes en contacto con el solvente son de acero inoxidable, zafiro, rubí y teflón (37).

2.4.3 INYECTORES.

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en solución sin interrumpir el caudal de solvente a través del sistema. El inyector debe reunir una serie de características importantes, entre ellas (38):



- Debe ser fácil de operar.
- Debe ser inerte al ataque químico y capaz de soportar altas presiones.
- Debe ser preciso en cuanto a la cantidad de muestra introducida en el sistema.
- No debe provocar diluciones importantes de la solución inyectada.
- En casos especiales puede requerirse que opere a ciertas temperaturas.

Actualmente la totalidad de los inyectores de CLAR son válvulas que orientan el caudal hacia la columna, pasando o no, según su posición, a través de un loop en el cual se introduce la solución a inyectar. Las válvulas pueden accionarse manual o automáticamente, están constituidas por un cuerpo fijo, un rotor con un sello que gira y un loop de muestra externo que contiene la muestra. El loop es intercambiable, de modo que la cantidad de muestra inyectada puede escogerse entre una serie de medidas estándar (38).

Existen inyectores automáticos que emplean válvulas de inyección de 6 vías que se accionan eléctrica o neumáticamente, la precisión obtenida con



estos inyectores es en general, superior a la de los métodos manuales porque no dependen de la habilidad del operador (38).

2.4.4 DETECTORES.

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica (37,38).

Los detectores deben reunir ciertas características (37,38):

- Tener un amplio rango dinámico de respuesta. El rango dinámico se define como “el rango de concentraciones de una sustancia en análisis en la que un cambio en la concentración produce un cambio en la señal”, como puede deducirse, esto incluye tanto la respuesta lineal como no lineal. El valor mínimo de este rango se define como la “detectabilidad mínima”.
- Poseer una respuesta lineal. El detector debe medir alguna propiedad del analito que se incremente linealmente al aumentar su concentración. Se



denomina rango lineal de un detector al rango de concentraciones que produce una respuesta lineal, este rango está incluido en el rango dinámico.

- No contribuir al ensanchamiento de banda extracolumnar. El ensanchamiento de banda extracolumnar se refiere a la pérdida de eficiencia no adjudicable a la columna sino a la construcción del equipo cromatográfico, tanto en las dimensiones de la celda como en la longitud y en el diámetro de la tubería de conexión. Para evitarlo, la celda del detector deberá tener un volumen tan pequeño como sea posible sin que ello perjudique la sensibilidad de la detección.
- Responder a todos los solutos. La situación ideal es que el detector responda a todo tipo de solutos, pero ésto no siempre es posible en CLAR, debido a que para la detección deben obtenerse instrumentos capaces de medir una propiedad diferencial entre un líquido (la fase móvil) y un sólido (los analitos disueltos).
- Tener una sensibilidad apropiada. Habitualmente esta propiedad se contrapone con la universalidad de detección. Es decir que detectores que responden a todos los analitos en general, poseen sensibilidades menores, y en contrapartida, detectores que poseen una alta sensibilidad, no responden a todos los solutos.



- No afectarse por cambios de temperatura.
- Poseer una buena relación señal/ruido. El ruido de un detector es la máxima amplitud de la combinación de los términos de ruido largo y cortos en un período de tiempo dado. Estas perturbaciones que se producen en la línea de base del detector se deben a la electrónica propia del instrumento, a problemas relacionados con las variaciones de temperatura, oscilaciones de la tensión de la línea eléctrica o a fluctuaciones en el caudal. El límite de detección de un analito determinado está en estrecha relación con el valor de ruido del instrumento. Cuanto mayor sea el ruido peor será el valor de límite de detección.
- No destruir la muestra. Esta propiedad es una característica de casi todos los detectores de CLAR (con excepción del electroquímico) y resulta muy importante cuando se desea recolectar al analito aislado.
- Tener una constante de tiempo baja. La constante de tiempo de un detector indica la velocidad con que éste responde a un cambio instantáneo de la concentración del analito. A menor valor de constante de tiempo la filtración de los ruidos será menor y la respuesta será más rápida.



Los detectores pueden clasificarse en generales y selectivos. Los detectores generales miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. Ejemplos típicos son el detector de índice de refracción y el de conductividad. Los detectores selectivos son aquellos sensibles a alguna propiedad del soluto, por ejemplo el detector UV, que producirá una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada (37,38).

2.4.5 FASE MÓVIL.

La fase móvil en CLAR cumple un rol fundamental, ya que puede por sí misma, modificar completamente la selectividad de las separaciones, ya que es posible lograr un número muy grande de diferentes separaciones con una columna, tan sólo variando la composición de la fase móvil (37).

Se debe tener en cuenta que no todos los solventes son adecuados para trabajar en CLAR, ya que la condición de estado líquido no es suficiente por sí misma para que una sustancia se pueda emplear como fase móvil. Un



solvente apropiado para CLAR debe cumplir con algunas propiedades, entre las cuales se pueden destacar las siguientes (37):

- Alto poder solubilizante de las muestras.
- Baja reactividad.
- Compatibilidad con el detector utilizado.
- Adecuado punto de ebullición.
- Baja viscosidad.
- Seguridad.
- Alto grado de pureza.

Los solventes más comúnmente empleados en CLAR son: acetato de etilo, metanol, hexano, alcohol isopropílico, cloroformo, tetracloruro de carbono, tetrahidrofurano, acetonitrilo, entre otros (37).

2.4.6 COLUMNAS Y FASES ESTACIONARIAS

La fase estacionaria normalmente está empacada en un tubo de algún material inerte (generalmente de acero inoxidable) através del cual pasa la fase móvil (37).



Las columnas deben estar empacadas con partículas definidas por una serie de características (37):

- Morfología
- Tamaño
- Porosidad
- Estructura química

El material empleado puede ser irregular o esférico y un tamaño entre las 2 y 60 μm de diámetro. Es más común emplear partículas esféricas debido a que este tipo de partículas son menos sensibles al desgaste al presentar menor resistencia mecánica y mayor permeabilidad al paso de la fase móvil, resultando en menores presiones (37).

El tamaño de partícula controla el proceso de difusión de las moléculas desde la fase móvil hacia la fase estacionaria, por lo que a medida que el tamaño de partícula aumenta, el proceso de difusión se hace más lento y la columna pierde capacidad resolutive y eficiencia (37).



En relación a la porosidad, en general, a menor diámetro de poro corresponde mayor área superficial de contacto y consecuentemente mayor retención (37).

Con respecto a la estructura química, el material de empaque debe poseer una estructura resistente a los solventes de la fase móvil, además debe ser estable a valores dados de pH. El material más comúnmente empleado es la sílica. Este material puede ser modificado por una derivatización química de los grupos silanoles y de esta forma se obtienen una gran variedad de fases estacionarias. La fase estacionaria modificada que es empleada más comúnmente es la octadecilsilano (ODS), su uso se sugiere cuando el soluto tiene moderada o alta lipofilidad. La sílica no modificada es empleada cuando la fase móvil sea menos polar que la fase estacionaria, empleando una fase móvil no-acuosa (37).

La capacidad o poder de resolución de la columna depende de su longitud, diámetro interno y su material de empaque. La característica que tiene mayor influencia en los resultados generados es el tamaño. Si la columna es demasiado corta, no tendrá la capacidad suficiente para permitir



una separación, y si por el contrario, la columna es demasiado larga, el tiempo de análisis necesariamente se prolongará. Las longitudes más comúnmente empleadas son 10, 12.5 y 25 cm. Las columnas analíticas tienen diámetros internos de alrededor 5 mm, siendo el más común de 4.6 mm. Se recomienda el empleo de diámetros internos pequeños debido a que se reduce considerablemente el consumo de fase móvil e incrementa la sensibilidad (37).

2.5 VALIDACIÓN DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

La validación es la evidencia experimental documentada que incluye todos los procedimientos necesarios para demostrar que un método para la determinación cuantitativa de un analito, en una matriz biológica, es adecuado para cumplir el propósito por el que fue diseñado.

Antes de la utilización del método para un análisis de muestras, el analista debe obtener suficientes datos que evalúen el desempeño y capacidad del método para obtener resultados confiables. Esta evaluación se realiza mediante un estudio de validación.



Los parámetros de validación de mayor relevancia establecidos por diferentes organismos regulatorios (FDA, CEE, NOM), son los siguientes: linealidad, precisión, exactitud, límite de cuantificación, límite de detección, selectividad, estabilidad de la muestra analítica, porcentaje de recuperación absoluta o relativa, entre otros.

2.5.1 Linealidad

- Linealidad es la capacidad de un método analítico, en un intervalo de trabajo, para obtener resultados que sean directamente proporcionales a la concentración del compuesto en la muestra. Se evalúa tanto la linealidad del sistema como la del método. De acuerdo a las especificaciones, el sistema se considera lineal si el coeficiente de correlación es mayor o igual a 0.99 y el error relativo debido a la regresión no mayor del 2%. Para que el método se considere lineal el coeficiente de correlación debe ser mayor a 0.99.

El coeficiente de correlación se obtiene mediante un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados, en donde se utiliza la siguiente fórmula:

$$r = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}}$$



Donde:

r= Coeficiente de correlación

x= Concentración

y= Respuesta

Para calcular el error relativo debido a la regresión se emplea la siguiente fórmula:

$$\text{error relativo} = (S_y/x) / \bar{y}$$

$$S_y/x = \sqrt{\frac{\sum y^2 - \text{pendiente} (\sum xy) - \text{ordenada} (\sum y)}{n - 2}}$$

Donde:

S_y/x = Varianza

\bar{y} = Respuesta promedio

y= Respuesta

x= Concentración

n= No. de datos



2.5.2 Precisión

- Precisión, es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea del producto, se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad.
- a) Repetibilidad se define como la precisión de un método analítico que expresa la variación dentro de un mismo laboratorio obtenida entre determinaciones independientes realizadas en las mismas condiciones. Para considerar un método repetible, el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

Para calcular el coeficiente de variación se recurre a la siguiente ecuación:

$$\text{C.V.} = \frac{S_x}{\bar{x}}$$

$$S_x = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum (x_i - \bar{x})^2}$$



Donde:

S_x = Desviación estándar
 \bar{x} = Concentración promedio
 x = Concentración
 n = No. de datos

b) Reproducibilidad intralaboratorio, es la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas. Un método es reproducible cuando el coeficiente de variación no es mayor del 15%, el cual se determina con la fórmula expresada anteriormente.



2.5.3 Exactitud

- Exactitud es la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia. Se determina mediante la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones experimentales de cada nivel de la curva, con respecto a la concentración nominal de la muestra, de la siguiente manera:

$$\% \text{ Desv. Absoluta} = 100 \times \frac{(\text{Conc. Nominal} - \text{Conc. Experimental prom.})}{\text{Conc. Nominal}}$$

La concentración experimental en caso de análisis por CLAR, se obtiene tratando la relación de alturas de los estándares de la curva considerados como desconocidos e introduciéndolos en la ecuación derivada del análisis de regresión lineal de la curva de referencia en plasma (proveniente de pesada independiente), para obtener los valores de "cantidad recuperada" o "cantidad experimental".

Para considerar el método como exacto, el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración deben estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.



2.5.4 Límite de cuantificación

- El límite de cuantificación es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método. Se establece que el punto tiene validez como límite de cuantificación si el valor promedio de las cinco repeticiones cae dentro del $\pm 20\%$ del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor del 20%.

2.5.5 Límite de detección

- El límite de detección es la mínima concentración de un compuesto en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, bajo las condiciones de operación establecidas. Como límite de detección se considera aquella concentración cuya respuesta es de 2 a 4 veces la señal del ruido de fondo.



2.5.6 Selectividad

- Selectividad es la capacidad de un método analítico para cuantificar exacta y específicamente el compuesto a analizar, en presencia de otros compuestos que pudieran estar presentes en la muestra.

2.5.7 Recuperación relativa

- Recuperación relativa es la eficiencia de un método analítico para cuantificar el o los compuestos por analizar en la muestra biológica. Se evalúa determinando el porcentaje de recuperación a cada nivel de concentración, el cual debe ser consistente en cada nivel de concentración dentro del rango.

2.5.8 Estabilidad de la muestra analítica

- Estabilidad de la muestra analítica, es la propiedad del compuesto por analizar, de conservar sus características en la matriz biológica, desde el momento del muestreo hasta su análisis. Se determina evaluando el porcentaje de desviación absoluta, el cual deberá ser menor al 15%.



III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PRAZICUANTEL EN PLASMA

3.1.1 Material, equipo e instrumentos

- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Perkin Elmer equipado con:

Bomba binaria LC 250.

Detector de longitud de onda variable UV-VIS, modelo LC-95.

Válvula de inyección con loop de 20 μ L.

- Balanza analítica Sartorius, modelo 1800.
- Centrifuga Beckman, modelo TJ-6.



- Agitador Sybron Thermolyne, tipo 16700 Maxi Mix I.
- Micropipeta Eppendorff de 100 a 1000 μ l.
- Micropipeta Finnpipette de 50 a 250 μ l.
- Ultrasonido Bransonic modelo PC 620.
- Equipo para filtración al vacío. Milli-Q con membrana de 0.45 μ m de porosidad.

3.1.2 Reactivos y sustancias de referencia

- Prazicuantel. Estándar secundario. Lote: 9002 01 11 02, donado por Bayer de México.
- Diazepam. Estándar secundario S/L.
- Acetona R.A., JT. Baker.
- Alcohol etílico R.A., JT. Baker.
- Eter isopropílico R.A., J.T. Baker.
- Acetato de etilo R.A., JT. Baker.
- Acetonitrilo, grado HPLC Mallinckrodt.
- Agua deionizada grado HPLC.



3.1.3 Preparación de las soluciones

- Solución Estándar de Prazicuantel en acetona. Pesar exactamente 10 mg de prazicuantel, sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con acetona (1.0 mg/mL). De esta solución, transferir 1.0 mL a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con acetona (100 $\mu\text{g/mL}$). A partir de la solución anterior, realizar las diluciones necesarias para obtener concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 $\mu\text{g/ml}$ (tabla 1). Tomar 1.0 mL de cada una de las soluciones y agregar 150 μL de estándar interno (Diazepam 10 $\mu\text{g/mL}$).
- Solución Estándar de Prazicuantel en plasma. Pesar exactamente 10.0 mg de prazicuantel, sustancia de referencia, transferir a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con plasma (1.0 mg/mL). De esta solución, transferir 1.0 mL a un matraz volumétrico de 10 mL y llevar a volumen con plasma (100 $\mu\text{g/mL}$). A partir de la solución



anterior, realizar las diluciones necesarias para obtener concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 y 4 $\mu\text{g/mL}$ (tabla 1).

Tabla 1. Preparación de la curva de calibración de praziquantel en plasma o acetona

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Alícuota de la solución de 100 $\mu\text{g/mL}$ (μL)	Volumen final con plasma o acetona (mL)
0.125	12.5	10
0.25	25	10
0.5	50	10
1	100	10
2	200	10
4	400	10

- Solución de Estándar Interno (E.I.). Pesar exactamente 10 mg de diazepam, sustancia de referencia, disolver y llevar a volumen de 10 mL con alcohol etílico (1.0 mg/ml). De esta solución tomar 1 mL y llevar a 10 mL con alcohol etílico (100 $\mu\text{g/ml}$). Finalmente, de la solución anterior, tomar 1 mL y llevar a volumen de 10 mL con alcohol etílico (10 $\mu\text{g/ml}$).
- Fase móvil. En una probeta de 1000 mL, medir con exactitud 450 mL de acetonitrilo y 500 mL de agua deionizada grado HPLC. Mezclar, filtrar



através del equipo Milli-Q y desgasificar por medio de ultrasonido durante 10 a 15 minutos.

3.1.4 Método de extracción

A 1 mL de muestra plasmática se le adicionan 150 μ L de la solución de Estándar Interno (Diazepam 10 μ g/ml). La muestra se agita durante 10 segundos en un vórtex, se le añaden 6 mL de mezcla de extracción éter isopropílico:acetato de etilo (45:55), agitando en vórtex durante 6 minutos. Posteriormente, la muestra se centrifuga durante 15 minutos a 3000 r.p.m. Las fases se separan y la fase orgánica se evapora a sequedad bajo corriente de nitrógeno a 40°C. El residuo se reconstituye en 40 μ L de fase móvil acetonitrilo:agua (55:45).



Procedimiento: se inyectan 20 μL al sistema cromatográfico, utilizando las siguientes condiciones cromatográficas:

- Columna: Waters Spherisorb ODS2, 4.6 x 250 mm ID, tamaño de partícula 5 μm .
- Velocidad de flujo: 1.5 mL/min.
- Temperatura ambiente.
- Longitud de onda: 217 nm.
- Tiempo de corrida: 10 min.

En la figura 2 se muestra el diagrama del método analítico empleado para extraer prazicuantel.

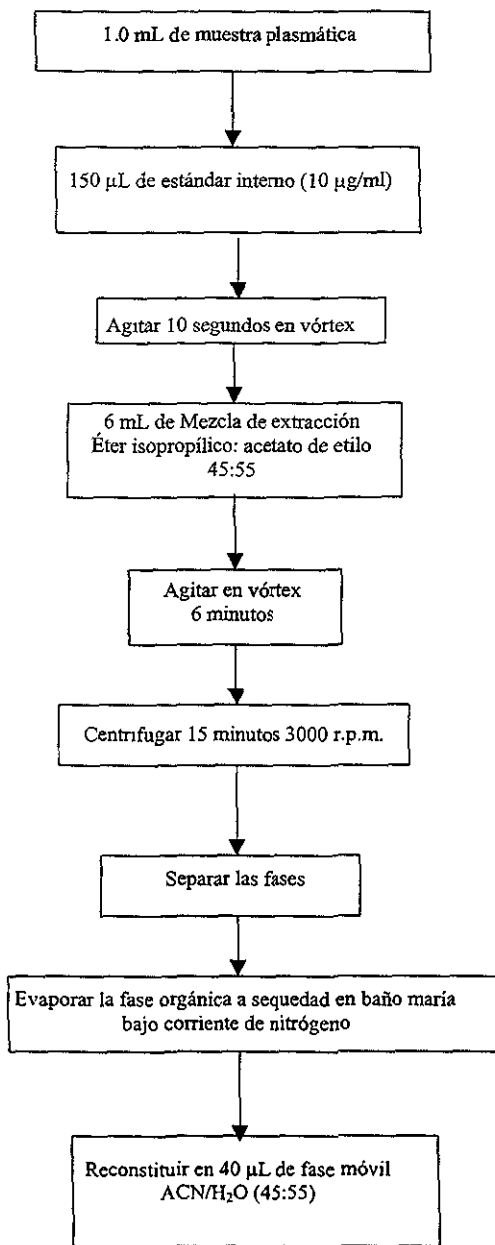


Figura 2. Diagrama para la extracción de PZQ en plasma



VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA CUANTIFICAR PRAZICUANTEL EN PLASMA

3.2. Validación del sistema.

3.2.1. Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema se determinó preparando, a partir de pesadas independientes, 3 curvas patrón de prazicuantel en acetona, en el intervalo de concentraciones de 0.125-4 $\mu\text{g/mL}$. Se tomó 1 mL de cada solución y se les agregaron 150 μL de E.I., se evaporaron bajo corriente de nitrógeno a 40°C, se reconstituyeron en 0.4 mL de fase móvil y se inyectaron 20 μL al cromatógrafo. Se graficó la relación de alturas (PZQ/EI) contra la concentración y para cada curva se determinó, por un ajuste de mínimos cuadrados, el coeficiente de correlación (r), el coeficiente de determinación (r^2) y el error debido a la regresión.



3.3 Validación del método

3.3.1 Linealidad del método

Para evaluar la linealidad del método, se prepararon 3 curvas patrón de prazicuantel en plasma a partir de pesadas independientes, en el intervalo de concentraciones de 0.125-4 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras se procesaron y se inyectaron de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente (inciso 3.1.4). Se graficó la relación de alturas (PZQ/EI) contra la concentración y para cada curva se determinó el coeficiente de correlación (r), y el coeficiente de determinación (r^2).

3.3.2 Precisión del método

▪ 3.3.2.1 Repetibilidad del método

Este parámetro se evaluó en un mismo día de trabajo, bajo condiciones idénticas de analista, equipo y laboratorio. Se prepararon tres curvas patrón de PZQ en plasma en el intervalo de concentraciones de 0.125-4 $\mu\text{g/mL}$ y se procesaron de acuerdo al procedimiento mencionado anteriormente (inciso 3.1.4). Se determinó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de cada nivel de concentración.



3.3.2.2 Reproducibilidad del método

Para evaluar la reproducibilidad del método, se prepararon 3 curvas patrón de prazicuantel en plasma en el intervalo de concentraciones ya mencionado, en tres días continuos de trabajo, conservando las mismas condiciones de equipo y laboratorio. Se determinó el promedio, desviación estándar y el coeficiente de variación para cada nivel de concentración.

3.3.3 Exactitud del método

Se evaluó a partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad. Se determinó la desviación absoluta del valor promedio de las concentraciones experimentales de cada nivel de la curva, con respecto a la concentración nominal de la muestra (Sección 2.5.3), tomando como referencia, la curva de calibración en plasma proveniente de una pesada independiente.



3.3.4 Límite de cuantificación

Se evaluó, preparando soluciones de PZQ en plasma en concentraciones de 0.06 $\mu\text{g/mL}$, 0.09 $\mu\text{g/mL}$ y 0.125 $\mu\text{g/mL}$ por quintuplicado. Se determinó el porcentaje de desviación absoluta y el coeficiente de variación.

3.3.5 Límite de detección

Se evaluó preparando muestras de prazicuantel en plasma en el intervalo de concentraciones de 31.15-62.5 ng/ml, determinando la relación de alturas (PZQ/E.I.) para estas concentraciones, así como la señal de ruido de fondo.

3.3.6 Selectividad

Se determinó analizando muestras blanco de plasma (provenientes de dos voluntarios), muestra de plasma adicionada con cafeína, ranitidina, carbamazepina y fenitoína, muestra de plasma adicionado con PZQ y estándar interno, muestra de plasma conteniendo PZQ, cafeína, ranitidina, carbamazepina, fenitoína y estándar interno.



3.3.7 Recuperación relativa.

Se prepararon tres curvas patrón en plasma, en el intervalo de concentraciones ya indicadas. Los resultados de concentración obtenida en plasma, se compararon con los resultados de concentración en solución (acetona) en el mismo intervalo, determinando el porcentaje de recuperación a cada nivel de concentración.

3.3.8 Estabilidad de la muestra analítica

Se determinaron las condiciones de temperatura y tiempo en las que el prazicuantel podía permanecer estable en plasma durante su almacenamiento, para ello se evaluó la respuesta de muestras preparadas por duplicado a tres niveles de concentración (alto, medio y bajo) dentro del intervalo de trabajo, bajo las siguientes condiciones:

Estabilidad de la muestra en refrigeración

Para establecer la estabilidad de las muestras en refrigeración, se prepararon por duplicado muestras de prazicuantel con concentraciones de 0.2, 1.5 y 3.5 $\mu\text{g/ml}$ en plasma, las cuales se mantuvieron en refrigeración a



5°C. Las muestras se analizaron al tiempo cero, 30 y 60 días después de su preparación.

Estabilidad de la muestra durante ciclos congelación-descongelación.

Se evaluó preparando por duplicado muestras de prazicuantel con concentraciones de 0.2, 1.5 y 3.5 $\mu\text{g/ml}$ en plasma, las cuales se mantuvieron en congelación a -20°C . Las muestras se analizaron al tiempo cero y se descongelaron a los 30 y 60 días después de su preparación para su análisis.

3.4 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO EN VOLUNTARIOS SANOS

Para demostrar que el método analítico para cuantificar prazicuantel en plasma validado anteriormente, servía para cuantificar muestras de pacientes y/o voluntarios, se analizaron muestras de dos voluntarios sanos de sexo masculino, provenientes de un estudio de farmacocinética de prazicuantel, llevado a cabo dos semanas antes en el laboratorio de Neuropsicofarmacología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez". Las muestras permanecieron congeladas a -20°C hasta el día de su análisis.



Las muestras plasmáticas se analizaron utilizando el método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución previamente validado.

Para iniciar el análisis, se procesó una curva de calibración en plasma, la cual debía cumplir con los criterios establecidos en la validación. La concentración de prazicuantel en las muestras plasmáticas analizadas, se determinó sustituyendo los valores de relación de alturas de cada muestra en la ecuación de la recta de la curva de calibración, generada por un ajuste de mínimos cuadrados.

Así mismo, para demostrar la validez de la corrida, se prepararon puntos control en plasma a tres niveles de concentración (alto, medio y bajo), dentro del intervalo de trabajo, los cuales debían de cumplir con los criterios de precisión y exactitud establecidos en la validación del método.

A partir de los datos de concentración plasmática, se graficaron los perfiles de concentración vs tiempo de muestreo y se obtuvieron para cada sujeto los parámetros farmacocinéticos de área bajo la curva (ABC, estimada



por el método trapezoidal), concentración plasmática máxima (C_{max}) y el tiempo al cual se alcanza dicha concentración (T_{max}), determinados directamente de la gráfica individual de concentración plasmática contra tiempo, la constante de eliminación aparente (K_e), determinada mediante el método de residuos y su correspondiente tiempo de vida media ($t_{1/2}$) calculado como $0.693/K_e$.



IV. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. VALIDACIÓN DEL SISTEMA

4.1.1 Linealidad del sistema.

En la figura 3 se presentan los resultados obtenidos en la evaluación de la linealidad del sistema, en donde podemos observar que el coeficiente de regresión lineal fue de 0.9993 y el error relativo debido a la regresión de 0.0345, indicando que la relación matemática entre concentración y respuesta, es continua y reproducible.

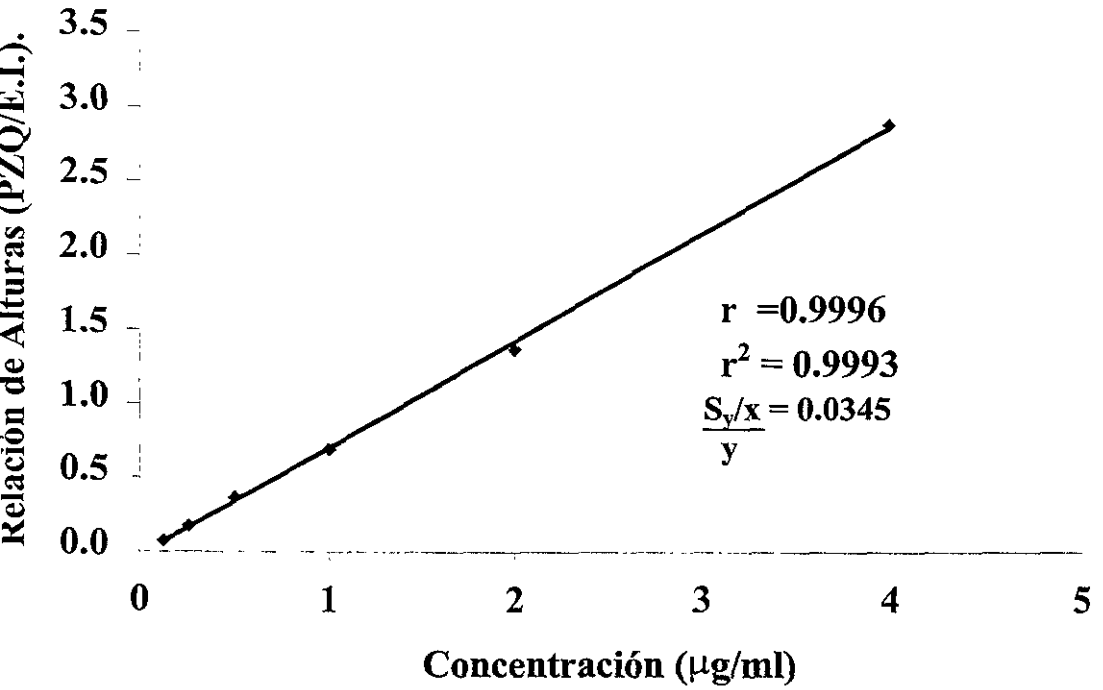


Figura 3. Linealidad del sistema para la cuantificación de PZQ.



4.2 VALIDACIÓN DEL METODO

4.2.1 Linealidad del método

La figura 4 muestra la linealidad promedio del método analítico en un intervalo de concentraciones entre 0.125 y 4 $\mu\text{g/mL}$, obteniendo un coeficiente de correlación promedio de 0.9997 lo cual indica que la relación matemática entre concentración y respuesta es continua dentro del intervalo de concentraciones de trabajo. En la tabla 2 se presentan los valores de la relación de alturas promedio de las 3 curvas preparadas en plasma para evaluar la linealidad del método, en donde observamos un C.V. que varía entre 1% y 8%, demostrando que dicha relación matemática es reproducible. Por lo anteriormente mencionado y de acuerdo a los criterios establecidos, el método analítico para la cuantificación de PZQ en plasma es lineal dentro del intervalo de 0.125 a 4 $\mu\text{g/mL}$.

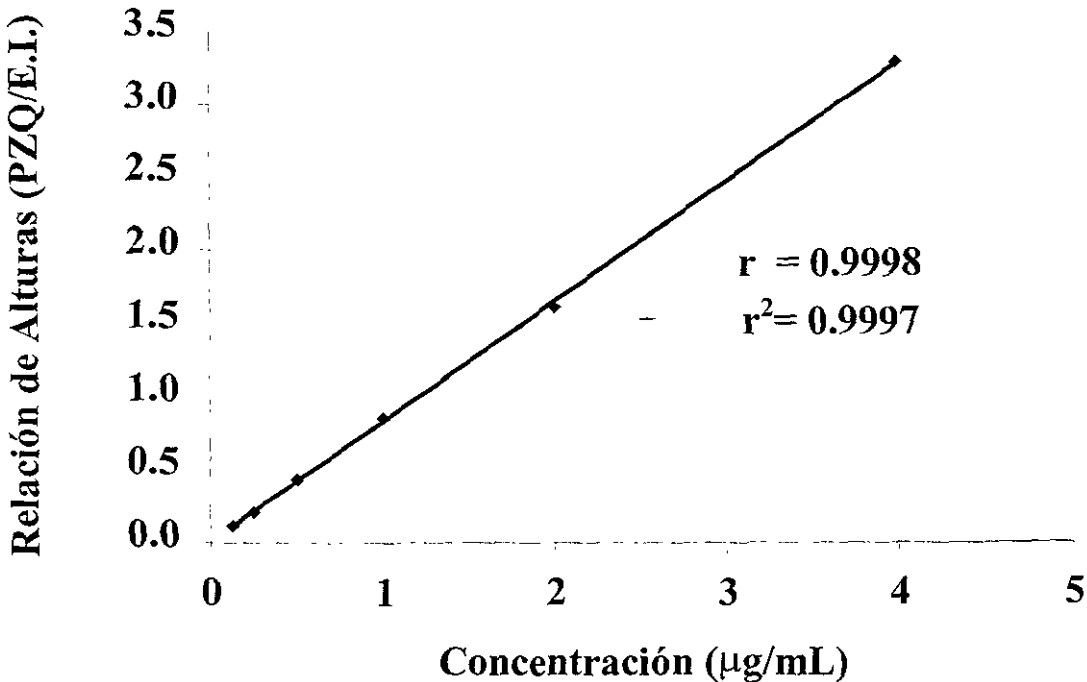


Figura 4. Linealidad del método analítico para la cuantificación de PZQ en plasma.

Tabla 2. Linealidad del método analítico para la cuantificación de PZQ en plasma.

Concentración µg/mL	Relación de Alturas Promedio PZQ/EI	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (%)
0.125	0.1157	0.0096	8%
0.25	0.2094	0.0029	1%
0.5	0.4299	0.0107	2%
1	0.8549	0.0454	5%
2	1.6139	0.0321	2%
4	3.2941	0.0930	3%

$$r=0.9998$$

$$r^2=0.9997$$

4.2.2 Precisión del método

4.2.2.1 Repetibilidad del método

En la tabla 3 se presentan los resultados de la repetibilidad del método analítico que se obtuvieron al evaluar 3 curvas de calibración de PZQ en plasma, que fueron analizadas por el mismo analista, bajo las mismas condiciones de trabajo y en el mismo día.

Los datos indican que los coeficientes de variación se encuentran dentro de un intervalo que varía entre 1% y 8% por lo que según las especificaciones,



el método analítico para cuantificar PZQ en plasma, es repetible, ya que los coeficientes de variación no son mayores al límite, cuyo valor es del 15%.

Tabla 3. Repetibilidad del método analítico para la cuantificación de PZQ en plasma.

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Relación de Alturas promedio PZQ/EI			Promedio	D.E.	CV (%)
	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
0.125	0.1264	0.1129	0.1079	0.1157	0.0096	8%
0.25	0.2123	0.2092	0.2066	0.2094	0.0029	1%
0.5	0.4266	0.4212	0.4418	0.4299	0.0107	2%
1	0.8986	0.8583	0.8079	0.8549	0.0454	5%
2	1.6486	1.6081	1.5851	1.6139	0.0321	2%
4	3.3494	3.1867	3.3461	3.2941	0.0930	3%

4.2.2.2 Reproducibilidad del método

En la tabla 4 se encuentran los resultados de la reproducibilidad del método analítico para cuantificar PZQ en plasma. Se presentan los resultados promedio para cada día evaluado así como la variación total, expresada como CV. Los resultados demuestran que los coeficientes de variación para las curvas se encuentran entre el 1 y el 6%, por lo que de acuerdo a las especificaciones con relación a este parámetro de validación, cumple satisfactoriamente con los criterios establecidos que indican que los coeficientes de variación no deben ser mayores al 15%. Por lo tanto, el método analítico fué reproducible en las condiciones intradía de análisis.



Tabla 4. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de PZQ en plasma.

Concentración $\mu\text{g/mL}$	Relación de Alturas promedio PZQ/EI			Promedio	D.E.	CV (%)
	Día 1	Día 2	Día 3			
0.125	0.1241	0.1233	0.1283	0.1252	0.0027	2%
0.25	0.2253	0.2125	0.2398	0.2259	0.0137	6%
0.5	0.4575	0.4116	0.4538	0.4410	0.0255	6%
1	0.9555	0.8652	0.9145	0.9117	0.0452	5%
2	1.7447	1.6055	1.7448	1.6983	0.0804	5%
4	3.4394	3.3994	3.4670	3.4353	0.0340	1%



4.2.3 Exactitud del método

En la tabla 5 se muestran los resultados promedio de las concentración interpolada así como la variación con respecto a la concentración nominal, representada como porcentaje de desviación absoluta. Se puede observar que el promedio de la desviación con respecto a la concentración nominal para cada uno de los niveles de concentración, es menor al 15%, por lo que, el método es exacto al cumplir con la especificación establecida que indica que la desviación debe estar dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

Tabla 5. Exactitud del método para cuantificar PZQ en plasma

Curva de Referencia ($\mu\text{g/mL}$)	Concentración experimental ($\mu\text{g/mL}$)		Conc. Exp. Promedio ($\mu\text{g/mL}$)	%Desv. Absoluta
	Curva 1	Curva 2		
0.1282	0.1083	0.1382	0.1233	3.9
0.2316	0.2414	0.2333	0.2374	2.5
0.4896	0.4983	0.5393	0.5188	6.0
1.0577	1.0236	0.9435	0.9836	7.0
1.9604	2.0048	2.0215	2.0132	2.7
4.0076	3.9815	3.9988	3.9902	0.4



4.2.4 Límite de cuantificación

En la tabla 6 se muestran los resultados de relación de alturas de PZQ/EI para la concentración de $0.125 \mu\text{g/mL}$, en donde se observa que al cuantificar por quintuplicado dicha concentración, se obtiene un CV menor al 20%. En la misma tabla se presentan los resultados promedio del porcentaje de desviación absoluta, en donde se observa que el porcentaje de la desviación con respecto a la concentración nominal es inferior al 20%. Para las concentraciones de $0.06 \mu\text{g/mL}$ y $0.09 \mu\text{g/mL}$ no se cumplió con estos criterios, por lo tanto, la concentración mínima que es cuantificada con precisión y exactitud bajo las condiciones normales de trabajo, es de $0.125 \mu\text{g/mL}$

Tabla 6. Limite de cuantificación.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Relación de Alturas
0.125	0.1217
0.125	0.1264
0.125	0.1129
0.125	0.1266
0.125	0.130
Promedio	0.1235
Desviación Estándar	0.0066
C.V. (%)	5.4
%Desv. Abs. prom.	4.9



4.2.5 Límite de detección

El límite de detección fue de 0.06 $\mu\text{g/mL}$, la altura encontrada para esta concentración fue de 2.19, mientras que la señal de ruido de fondo presentó una altura de 1.077, considerando que a esta concentración, la respuesta correspondiente es aproximadamente 2 veces mayor que el ruido de fondo.

4.2.6 Selectividad

Después de añadir cafeína, ranitidina, carbamazepina y fenitoína a diferentes muestras plasmáticas y procesarlas de acuerdo a lo descrito anteriormente, no se observó ninguna señal que interfiriera con los picos de interés, por lo cual el método se consideró selectivo para la cuantificación de prazicuantel en plasma. En las figuras 5-8 se muestran los cromatogramas representativos al analizar:

- a) Muestra de plasma (Fig.5).
- b) Muestra de plasma adicionada con cafeína, ranitidina, carbamazepina y fenitoína (Fig. 6).
- c) Muestra de plasma adicionado con PZQ y estándar interno (Fig. 7).
- d) Muestra de plasma conteniendo PZQ, cafeína, ranitidina, carbamazepina, fenitoína y estándar interno (Fig. 8).

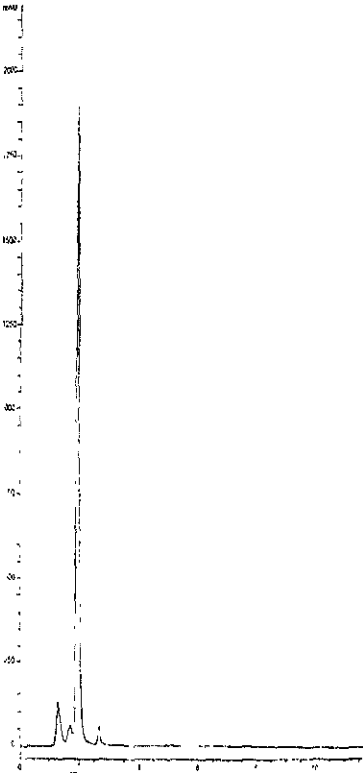
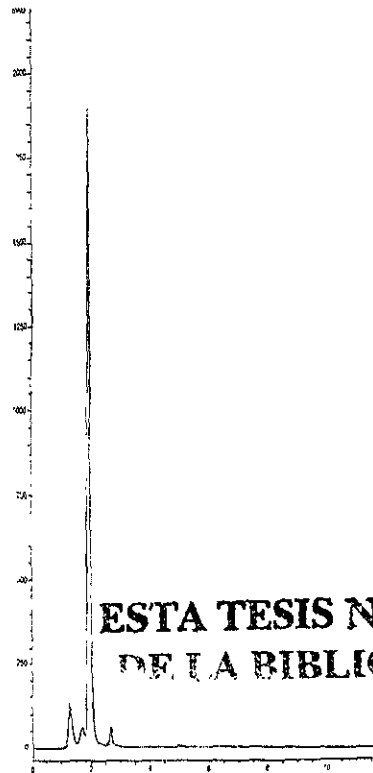


Figura 5. Muestra de plasma



**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Figura 6. Muestra de plasma adicionada con cafeína, ranitidina, carbamazepina y fenitoína.

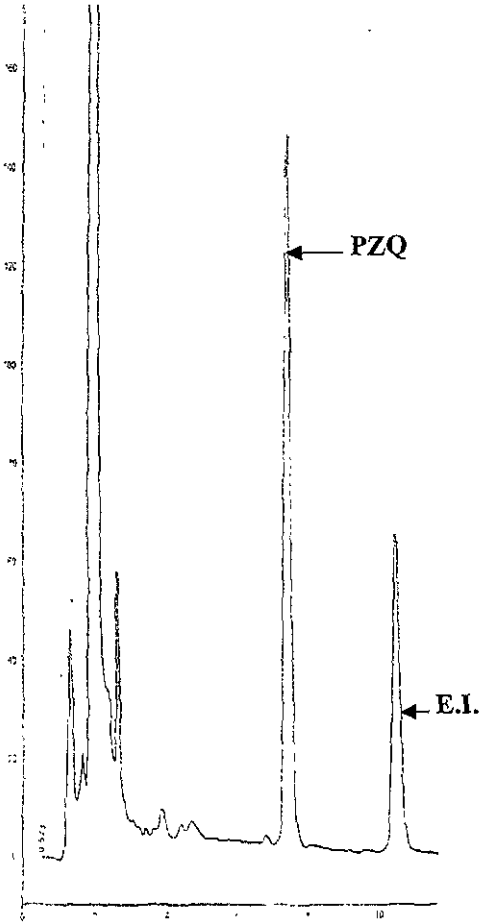


Figura 7 Muestra de plasma adicionado con PZQ y E.I.

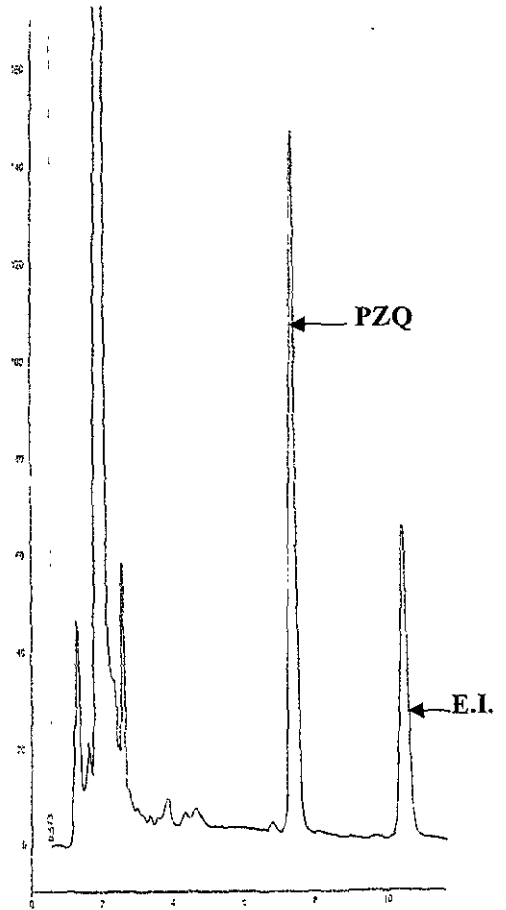


Figura 8. Muestra de plasma conteniendo PZQ, cafeína, ranitidina, carbamazepina, fenitoína y E. I.



4.2.7 Recuperación relativa

En la tabla 7, se muestra el porcentaje de recobro obtenido para PZQ en plasma. En la tabla se puede observar que la recuperación promedio estuvo entre 91.9% y 99.7%. Las especificaciones indican que el porcentaje de recuperación no debe ser necesariamente del 100% pero debe ser consistente en cada nivel de concentración, al cumplirse satisfactoriamente el apartado, el método analítico cumple con este parámetro de validación.

Tabla 7. Recuperación relativa de PZQ.

Concentración (µg/mL)	Relación de alturas en acetona	Relación de alturas en plasma promedio	% de Recobro Promedio
0.125	0.0785	0.0735	93.63
0.25	0.1605	0.1555	96.88
0.5	0.3789	0.3739	98.68
1	0.7069	0.7019	99.29
2	1.3976	1.3926	99.64
4	2.8920	2.8870	99.82



4.2.8 Estabilidad de la muestra analítica

Estabilidad de las muestras en refrigeración (5°C)

En la tabla 8 se muestran los resultados de estabilidad para muestras plasmáticas de PZQ, las cuales estuvieron almacenadas bajo condiciones de refrigeración a 5°C. Las muestras fueron analizadas al tiempo cero, 30 y 60 días después de su preparación. Se puede observar que el porcentaje de desviación absoluta con respecto a la concentración inicial para los controles bajo, medio y alto, se encuentran por debajo del 15%, por lo que se concluye que las muestras plasmáticas con PZQ son estables hasta 60 días en condiciones de almacenamiento en refrigeración a 5°C.



Tabla 8. Estabilidad de las muestras en refrigeración.

	Tiempo cero		
	Control Bajo 0.2 µg/mL	Control Medio 1.5 µg/mL	Control Alto 3.5 µg/mL
Conc. Exp.	0.2009	1.4581	3.5523
Conc. Exp.	0.2048	1.4515	3.4724
Promedio	0.2028	1.4548	3.5123
	30 días		
	Control Bajo 0.2 µg/mL	Control Medio 1.5 µg/mL	Control Alto 3.5 µg/mL
Conc. Exp.	0.2044	1.4331	3.4474
Conc. Exp.	0.2105	1.4502	3.3647
Promedio	0.2074	1.4416	3.4060
%Desv. Absoluta	2.27	0.90	3.03
	60 días		
	Control Bajo 0.2 µg/mL	Control Medio 1.5 µg/mL	Control Alto 3.5 µg/mL
Conc. Exp.	0.2083	1.5818	3.7079
Conc. Exp.	0.2113	1.4470	3.7294
Promedio	0.2098	1.5144	3.7187
%Desv. Absoluta	1.13	5.05	9.18



Estabilidad de las muestras en congelación

En la tabla 9 se muestran los resultados de estabilidad para muestras plasmáticas con PZQ que estuvieron en congelación y que fueron analizadas al tiempo cero, 30 y 60 días después de su preparación. Se observa que el porcentaje de desviación absoluta con respecto a la concentración inicial para los controles bajo, medio y alto se encuentra por debajo del 15%, indicando que las muestras son estables después de dos ciclos de congelación-descongelación a -20°C hasta 60 días después de su preparación.



Tabla 9. Estabilidad de las muestras en congelación.

	Tiempo cero		
	Control Bajo 0.2 µg/mL	Control Medio 1.5 µg/mL	Control Alto 3.5 µg/mL
Conc. Exp.	0.2083	1.4654	3.5627
Conc. Exp.	0.2080	1.4606	3.5731
Promedio	0.2081	1.4630	3.5679
	30 días		
	Control Bajo 0.2 µg/mL	Control Medio 1.5 µg/mL	Control Alto 3.5 µg/mL
Conc. Exp.	0.2089	1.4776	3.5314
Conc. Exp.	0.2085	1.4661	3.5627
Promedio	0.2087	1.4719	3.5471
%Desv. Absoluta	0.26	0.60	0.58
	60 días		
	Control Bajo 0.2 µg/mL	Control Medio 1.5 µg/mL	Control Alto 3.5 µg/mL
Conc. Exp.	0.2099	1.4759	3.5245
Conc. Exp.	0.2078	1.4509	3.4828
Promedio	0.2088	1.4634	3.5036
%Desv. Absoluta	0.07	0.57	1.22



4.3 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO EN VOLUNTARIOS SANOS

Después de haber validado el método analítico, se analizaron muestras de dos voluntarios sanos a los cuales se les administró PZQ, para probar que el método era capaz de cuantificar este fármaco en muestras plasmáticas de pacientes o voluntarios.

En la figura 9 se muestra la curva de calibración en plasma elaborada para la cuantificación de PZQ en las muestras. Todos los puntos de la curva cumplen con el parámetro de exactitud establecido durante la validación del método, y su coeficiente de correlación es de 0.9952.

Los resultados de las muestras de control de calidad sometidas a análisis para validar la corrida cromatográfica se muestran en la tabla 10, en la que se puede observar que todos cumplieron con el criterio de no superar el valor del $\pm 20\%$ de su concentración nominal respectiva, por lo que la corrida se consideró válida.

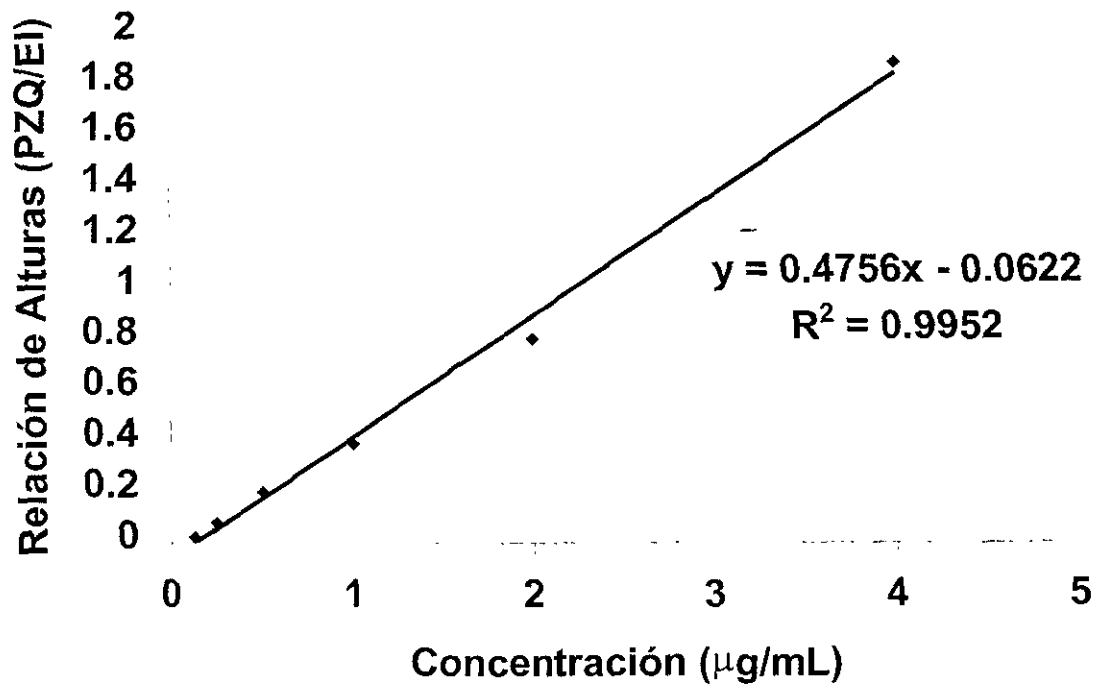


Figura 9. Curva de calibración para el análisis de las muestras.



Tabla 10. Análisis de los puntos de control de calidad.

Concentración real ($\mu\text{g/mL}$)	Relación de alturas (PZQ/EI)	Concentración interpolada ($\mu\text{g/mL}$)	Desv. Abs. (%)
0.2	0.0494	0.2051	3
0.75	0.3250	0.7916	6
3	1.3138	2.8952	3

A continuación se muestran los resultados de la cuantificación de los niveles de PZQ en plasma y los resultados de los parámetros farmacocinéticos calculados a partir de los datos de concentración plasmática.

Los valores de la concentración plasmática de PZQ para cada voluntario a cada tiempo de muestreo, después de la administración de 600 mg de PZQ se muestran en las tablas 11 y 12 y las gráficas correspondientes se muestran en las figuras 10 y 11.

En la tabla 13 se muestran los parámetros farmacocinéticos calculados a partir de los valores individuales de cada sujeto.



Tabla 11. Concentraciones plasmáticas de PZQ correspondientes al voluntario I

Tiempo (h)	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0	0.1526
0.25	0.2659
0.5	0.6891
1	1.2493
1.25	1.1883
1.5	1.0481
1.75	0.9767
2	0.8040
4	0.3305
6	0.2632
8	0.1896

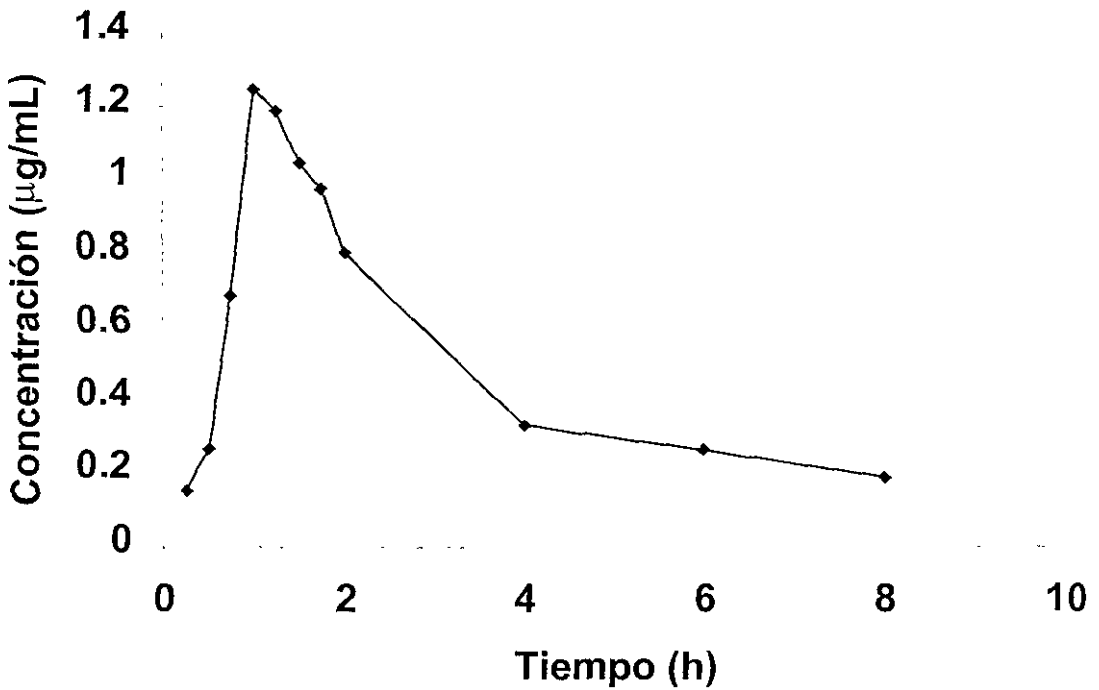


Figura 10. Gráfica de niveles plasmáticos de PZQ. Voluntario 1.



Tabla 12. Concentraciones plasmáticas de PZQ correspondientes al voluntario 2

Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)
0	0
0.25	0.1993
0.5	0.2577
1	0.5487
1.25	0.8658
1.5	1.2658
1.75	1.8344
2	1.7692
4	0.6564
6	0.4461
8	0.2414

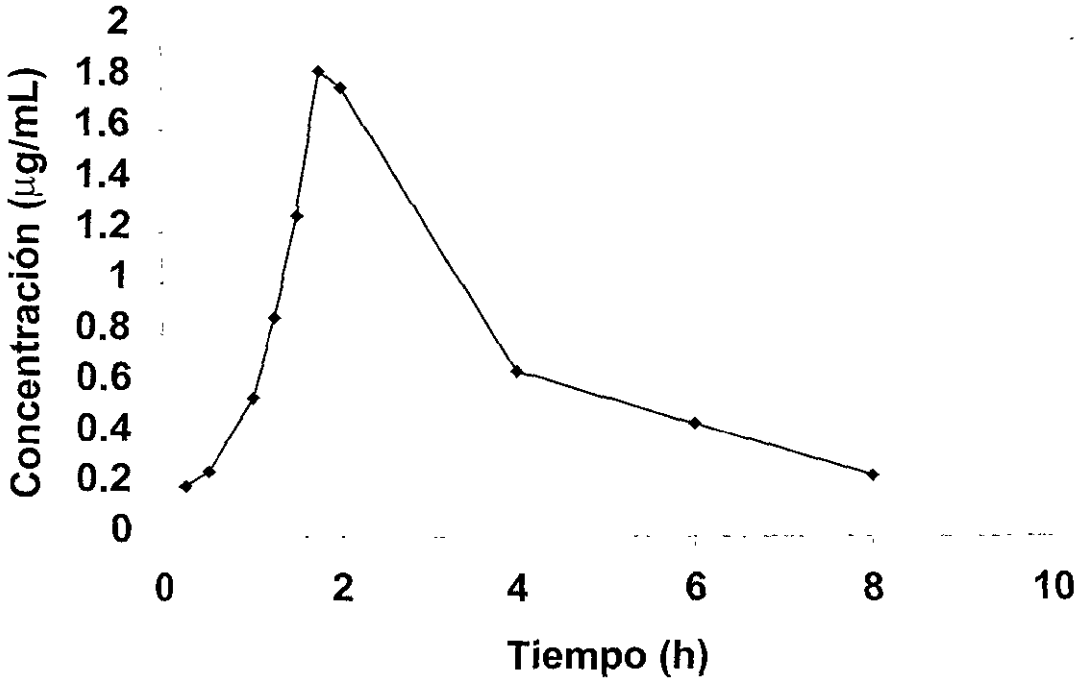


Figura 11. Gráfica de niveles plasmáticos de PZQ. Voluntario 2



Tabla 13. Parámetros farmacocinéticos. Voluntarios 1 y 2

Parámetro	Voluntario 1	Voluntario 2
ABC_{0-t} ($\mu\text{g}/\text{mL}/\text{h}$)	3.6739	3.7987
$ABC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}/\text{mL}/\text{h}$)	5.0390	4.5382
K_e (h^{-1})	0.1389	0.3265
$t_{1/2}$ (h)	4.989	2.212
K_a (h^{-1})	0.8307	1.977
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1.2493	1.8344
t_{max} (h)	1	1.75

Al analizar los parámetros farmacocinéticos de cada voluntario, se observan diferencias entre algunos de éstos, lo cual es debido a la gran variabilidad interindividual que presenta el PZQ (28). Sin embargo, se observa que los niveles plasmáticos obtenidos en el voluntario 2, se aproximan a los reportados en la literatura: Jung y cols. (31) reportan un $t_{1/2}$ de 2.33 ± 0.34 h después de la administración de una dosis única de 50 mg/Kg mientras que Watt y cols. (39) encontraron un valor de 2.1 ± 0.29 h después de una dosis oral de 40 mg/Kg. Con respecto a la constante de eliminación (K_e), Jung y cols. (31) reportan un valor promedio de 0.308 ± 0.43 , valor que no difiere del valor encontrado para el voluntario 2.



Si se comparan los valores obtenidos de t_{max} para ambos sujetos se observa poca variabilidad, así como en los valores de ABC_{0-1} y de $\Delta BC_{0-\alpha}$. El valor promedio reportado en la literatura por Jung y cols. para t_{max} es de 1.75h, observando que no difiere significativamente con el valor encontrado en el análisis para el voluntario 2. Sin embargo la constante de absorción (K_a) reportada por Jung y cols. es de 1.15 ± 0.36 por lo que difiere en aproximadamente 0.467 h^{-1} para el voluntario 2 y 0.0407 h^{-1} para el voluntario 1.

En general se observa hay cierta coincidencia entre los valores reportados en la literatura y los determinados para los sujetos en el análisis, puntualizando que para obtener más información, es necesario contar con un mayor número de voluntarios y realizar los estudios farmacocinéticos bajo el mismo esquema de dosificación.

De acuerdo a lo anterior, se propone que el método para cuantificar PZQ en plasma, utilizando una extracción líquido-líquido, validado anteriormente, es aplicable para cuantificar confiablemente PZQ en muestras plasmáticas de pacientes o voluntarios.



V. CONCLUSIONES

El método analítico desarrollado y validado, resultó ser:

- Lineal en plasma en el intervalo de concentraciones entre 0.125 y 4 $\mu\text{g/mL}$.
- Preciso (reproducibile y repetible) tanto en un día como en varios días, cuando el análisis es realizado por el mismo analista, en el mismo laboratorio, bajo las mismas condiciones de trabajo y el mismo equipo.
- Exacto en el intervalo de concentraciones entre 0.125 y 4 $\mu\text{g/mL}$.
- Sensible, ya que la concentración mínima detectable es de 0.06 $\mu\text{g/mL}$ y la concentración mínima que es cuantificada con precisión y exactitud es de 0.125 $\mu\text{g/mL}$.
- Selectivo, ya que no se presentaron interferencias del plasma ni de algunas sustancias exógenas (cafeína, ranitidina, carbamazepina y fenitoína).
- La muestra analítica es estable, al almacenarla en congelación y refrigeración durante 2 meses.



El método resultó adecuado para el análisis de muestras plasmáticas de voluntarios sanos que contengan prazicuantel. Por lo tanto, cabe suponer que es aplicable en muestras plasmáticas de pacientes a los que se les esté administrando dicho fármaco para el tratamiento de la neurocisticercosis.

Para aquellos estudios en los que se maneje un gran número de muestras, este método es adecuado ya que disminuyen considerablemente los costos y el tiempo necesario para realizar el análisis, además de que la técnica de extracción es sencilla y poco tóxica.



VI. BIBLIOGRAFÍA


1. Sotelo, J., Del Brutto, O. Neurocisticercosis. *Medicina de Hoy*. 6(2 y 3): 21-40 (1987).
2. Nieto, D. Historical notes on cysticercosis, In: Flisser A (ed) *Cysticercosis, present state of knowledge and perspectives*. Academic Press. Pags. 1-7 (1982).
3. Sotelo, J., Escobedo, F., Rodríguez-Carbajal, J., Torres, B., Rubio-Donnadieu, F. Therapy of parenchymal brain cysticercosis with praziquantel. *N. Engl. J. Med.* 310:1001-1007 (1984).
4. Del Brutto, O.H., Sotelo, J. Neurocysticercosis: An Update. *Rev. Infect. Dis.* 10 (6):1075-1087 (1988).
5. Escobar, A., Nieto, D. Parasitic diseases, *Pathology of the nervous system*. Vol. III. Pags. 2503-2521 (1972).



6. Sotelo, J., Del Brutto O. Diagnóstico y Tratamiento de la cisticercosis cerebral. En: Rodríguez Carbajal (ed). Homenaje al Dr. y Prof. Manuel Velasco Suárez. Pags. 382-392 (1989).
7. Sotelo, J., Guerrero, V., Rubio, F. Neurocysticercosis: A new classification based on active and inactive forms. Arch. Intern. Med. 145:442-442 (1985).
8. Sotelo, J., Del Bruto, O.H. Therapy of neurocysticercosis. Child's. Nerv. Syst. 3: 296-211 (1987).
9. The Index Merck. 15ª edición. Pag. 7896 (1997).
10. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas-PLM. 42ª ed. Versión multimedia (1998).
11. Goodman, G., Goodman and Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Ed. Panamericana, 8ª ed. Pags. 1086-1087 (1991).
12. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 7ª ed. Pags. 1721-1741 (1999).
13. Seubert, J., Pohlke, R., Loebich, F. Synthesis and properties of praziquantel, a novel broad spectrum antihelminthic with excellent activity against Schistosomes and Cestodes. Experientia. 33:1036-1037 (1977).
14. Groll, E. Praziquantel. Adv. Pharmacol. Chemoter. 20:219-235 (1980).



15. Andrews, P., Thomas, H., Pohlke, R., Seubert, J. Praziquantel. *Med. Res. Rev.* 3:147-200 (1983).
16. Andrews, P. Praziquantel: mechanisms of anti-schistosomal activity. *Pharmacol. Ther.* 29:129-156 (1985).
17. Sotelo, J., Jung, H. Pharmacokinetic optimisation of the treatment of neurocysticercosis. *Clin. Pharmacokinet.* 34(6):503-515 (1998).
18. Wu, M., Wei, C., Xu, Z., Yuan, H., Lian, W., Yang, Q., Chen, M., Jiang, Q., Wang, C., Zhang, S., Liu, Z., Wei, R., Yuan, S., Hu, L., Wu, Z. . Comparison of the therapeutic efficacy and side effects of a single dose of levo-praziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of Schistosomiasis japonica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45(3):345-349 (1991).
19. Harnett, W. The Antihelminthic Action of Praziquantel. *Parasitol. Today.* 4(5):144-146 (1988).
20. Day, T.A., Bennett, J.L., Pax, R.A. Praziquantel: The Enigmatic Antiparasitic. *Parasitol. Today.* 8 (10):342-344 (1992).
21. Redman, C.A., Robertson, A., Fallon, P.G., Modha, J., Kusel, J.R., Doenhoff, M.J., Martin, R.J. Praziquantel: An urgent and Exciting Challenge. *Parasitol. Today.* 12 (1): 14-18 (1996).

- 
-
22. Leopold, G., Ungethum, W., Groll, E., Diekmann, H.W., Nowak, H., Wegner, D.H.G. Clinical Pharmacology in normal volunteers of praziquantel, a new drug against schistosomes and cestodes. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 14:281-291 (1978).
23. Steiner, K., Garbe, A. The fate of praziquantel in the organism. II. Distribution in rats. *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* 2:97-106 (1976).
24. Bittencourt, P.R.M., Gracia, C.M., Gorz, A.M., Oliveira, T.V. High-dose praziquantel for neurocysticercosis: serum and CSF concentrations. *Acta. Neurol. Scand.* 82:28-33 (1990).
25. Masimirembwa, C.M., Hasler, J.A. Characterisation of praziquantel metabolism by rat liver microsomes using cytochrome P450 inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 48(9): 1779-1783 (1994).
26. Mandour, M., Hamid, T., Homeida, M.M.A., Sadig, T., Ali, H.M., Bennett, J.L., Leahey, W.J. Pharmacokinetics of praziquantel in healthy volunteers and patients with schistosomiasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 84: 389-393 (1990).
27. Velázquez, M.L., Jung, H., Sotelo, J. Plasma levels of praziquantel decrease when dexamethasone is given simultaneously. *Neurology.* 37(9):1561-1562 (1987).



28. Castro, N., González-Esquivel, D., Medina, R., Sotelo, J., Jung, H. The influence of cimetidine on plasma levels of praziquantel after a single day therapeutic regimen. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 49, 92-93 (1997).
29. Obermeier, J., Froberg, H. Mutagenicity studies with praziquantel, a new antihelminthic drug: tissue, host, and urine-mediated mutagenicity assays. *Arch Toxicol.* 38: 149-161 (1977).
30. Patzchke, K., Putter, J., Wegner, L.A., Horster, F.A., Diekmann, H.W. Serum concentrations and renal excretion in humans after oral administration of praziquantel- results of three determination methods-. *Eur. J. Drug. Met. Pharmacokinet.* 3:149-156 (1979).
31. Jung, H., Vázquez, M.L, Sánchez, M., Penagos, P., Sotelo, J. Clinical pharmacokinetics of praziquantel. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34: 335-340 (1991).
32. Putter, J. Fluorometric method for the determination of praziquantel in blood plasma and urine. *Eur. J. Drug. Met. And Pharm.* 4(3): 143-148 (1979).
33. Diekmann, H. W. Quantitative determination of praziquantel in body fluids by GLC. *Eur. J. Drug. Met. And Pharm.* 4(3):139-141 (1979).



34. Heintze, J., Fischbeck, H. Absolute β -Zählung an sättigungsdicken Präparatschichten. *Z.f. Physik* 147:277 (1957).
35. Xiao, S.H., Catto, B.A., Webster, L.T. Quantitative determination of praziquantel in serum by High-Performance-Liquid-Chromatography. *J. Chromatogr.* 275:127-132 (1983).
36. González-Esquivel, D. F., Morano, O.C., Rodríguez, S.M., Sotelo, J., Jung, H. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay from praziquantel in plasma, urine and liver homogenates. *J. Chromatogr.* 613:174-178 (1993).
37. Quatrocchi, O.A. Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Ed. Artes Gráficas Farro. Pags. 3-35, 89-123 (1992).
38. Lough, W. High Performance Liquid Chromatography. Fundamental Principles and Practice. Ed. Blackie Academic and Professional. Pags. 78-110 (1996).
39. Watt, G., White, N., Padre, L., Ritter, W., Fernando, M., Ranoa, C., Laughlin, W. Praziquantel pharmacokinetics and side effects in schistosoma japonicum-infected patients with liver disease. *J. Infect. Dis.* 157(3):530-535 (1998).



40. Braggio, S., Barnaby, R.J., Grossi, P., Cugola, M. A strategy for validation of bioanalytical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14:375-388 (1996).
41. Shah, V., Midha, K., Diche, S., McGilveray, L., Skelly, J., Yacobi, A., Layloff, T., Viswanathan, C., Cook, E., McDowall, R., Pittman, K., Spector, S. Analytical Methods Validation: Bioavailability, Bioequivalence, and Pharmacokinetic Studies. *J. Pharma. Sci.* 81(3):309-312 (1991).
42. Bioanalytical Methods Validation for Human Studies. Guidance for Industry. FDA. [J:/!guidance/2578dft.wpd](http://www.fda.gov/cder/rdmt/oc/2578dft.wpd). (1998)