

143



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ESCALAMIENTO DE LA SINTESIS Y DESARROLLO  
DE UNA FORMA FARMACEUTICA PARA EL  
FASCIOLICIDA ALFA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A :

**DAVID TAMAYO ESQUIVEL**



MEXICO, D. F.

2001/11/15



2001

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA



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.

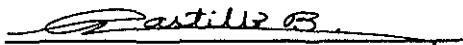
JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROF. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA  
VOCAL: PROFRA. MARÍA ISABEL AGUILAR LAURENTS  
SECRETARIO: PROF. JOSÉ BENJAMÍN ROBLES GARCÍA  
1er. SUPLENTE: PROF. FEDERICO GÓMEZ GARIBAY  
2do. SUPLENTE: PROF. JOAQUÍN GONZÁLEZ ROBLEDO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: DEPARTAMENTO DE FARMACIA  
(LAB. 122, 112 y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA), FACULTAD DE QUÍMICA,  
UNAM.

ASESOR DE TESIS:

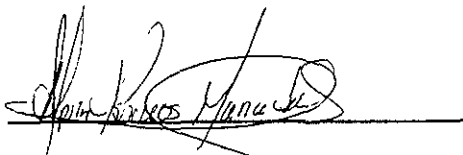
DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Castillo B.', written over a horizontal line.

SUPERVISOR TÉCNICO:


Q.F.B. SOCORRO ALPÍZAR RAMOS



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Socorro Alpizar Ramos', written over a horizontal line.

SUSTENTANTE:

DAVID TAMAYO ESQUIVEL



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'David Tamayo Esquivel', written over a horizontal line.

"La ciencia es por sí misma una especie de garantía de que tenemos la capacidad de madurar. Uno de nuestros problemas fundamentales y acuciantes es si podremos salir adelante como la especie social compulsiva, obsesiva y genéticamente dirigida, que, sin duda, somos."

HORACE FREELAND JUDSON (1984)

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Rafael Castillo Bocanegra todo el apoyo para la realización de esta tesis, pero sobre todo por haber sido guía y parte fundamental de mi formación académica.

A la maestra Alicia Hernández Campos por su invaluable asesoría en la síntesis del fasciolicida alfa. De la misma manera agradezco a la maestra Socorro Alpizar Ramos su ayuda en la formulación de la suspensión.

A la Dra. María Isabel Aguilar Laurents y al Q.F.B José Benjamín Robles García por la revisión del trabajo escrito.

A la Dra. Helgi Jung Cook por permitir que se desarrollara parte de esta tesis en el laboratorio 112 y a la M. en C. Inés Fuentes Noriega por su valiosa orientación en el desarrollo de la metodología de HPLC.

Agradezco al Dr. Francisco Hernández Luis por sus consejos y orientación, y a todos los compañeros del laboratorio 122 por haberme brindado su amistad.

Al personal de la USAI, en especial a Rosa Isela del Villar, Margarita Guzmán, Marisela Gutiérrez y Georgina Duarte por su colaboración en la realización de los espectros.

A la Facultad de Química, Fundación UNAM y al grupo ROCHE-SYNTEX por las becas otorgadas durante mis estudios de licenciatura.

A PROBETEL y SEDESOL por el apoyo económico aportado para la realización de esta tesis.

A la Dirección General de Asuntos del personal Académico (DGAPA) por el financiamiento otorgado a los proyectos PAPIIT IN204998 y IN227998

## DEDICATORIAS

A mi papá Elías Tamayo Ortega, por el apoyo y la motivación que recibí para culminar esta meta.

A mi mamá Catalina Esquivel Valdés de quien he recibido cariño, comprensión y confianza.

A Nancy y Rocío por haber compartido los mejores años de nuestras vidas: la infancia.

A mis tíos Ramón, Pascual y Rosa por todo lo que me han enseñado con su ejemplo.

A Begoña por todos los bellos momentos que hemos compartido.

A Rafael, Jorge, Ernesto, Sergio y Julio por ser compañeros de tantas y tantas aventuras.

A Paola y Alfonso por haber hecho de la Facultad de Química un lugar más agradable, con su insustituible compañía.

A Ma. Elena, Nahieli, Magdalena, Jiro y Santiago por su amistad y apoyo.

Y finalmente a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme formado humana y profesionalmente.

## CONTENIDO

	Pág.
1 RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3 ANTECEDENTES	
3.1 Fasciolosis	
3.1.1 Definición	5
3.1.2 El agente: <i>F. hepatica</i>	5
3.1.3 Ciclo Biológico	6
3.1.4 Distribución	8
3.1.5 Pérdidas económicas	9
3.1.6 Medidas de Prevención-Lucha-Control	10
3.1.7 Tratamiento	11
3.1.8 Triclabendazol	13
3.1.9 Fasciolicida Alfa	
3.1.9.1 Diseño	14
3.1.9.2 Solubilidad	15
3.1.9.3 Estudios de Actividad	15
3.1.9.4 Estudios Farmacocinéticos en Ovinos	17
3.1.9.5 Estudios Farmacocinéticos en Bovinos	18
3.2 Suspensiones	
3.2.1 Definición	19
3.2.2 Componentes	20
3.2.3 Ventajas y Desventajas	21
3.2.4 Estabilidad Física	21
3.2.5 Aspectos Físicoquímicos en el Desarrollo de una Suspensión	22
3.2.5.1 Propiedades Interfaciales	22
3.2.5.2 Identificación de Sistemas Floculados y Defloculados	25

---

3.2.5.3	Parámetros de Sedimentación	25
3.2.5.4	Tamaño de Partícula y Viscosidad	26
4	OBJETIVOS	28
5	DESARROLLO EXPERIMENTAL	
5.1	Síntesis	
5.1.1	Instrumentación	29
5.1.2	Equipo	29
5.1.3	Cromatografía	30
5.1.4	Sistemas de Elución	30
5.1.5	Ruta de Síntesis	31
5.1.6	Descripción de las Reacciones	
5.1.6.1	3,4-Dicloroacetanilida (2)	32
5.1.6.2	4,5-Dicloro-2-nitroacetanilida (3)	33
5.1.6.3	4,5-Dicloronitroanilina (4)	34
5.1.6.4	4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (5)	35
5.1.6.5	4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (6)	36
5.1.6.6	5-Cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol(7)	37
5.1.6.7	5-Cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (8)	38
5.2	Desarrollo de la Forma Farmacéutica	
5.2.1	Elección de una Forma Farmacéutica Adecuada	39
5.2.2	Desarrollo de un PNO para las Formulaciones 1,2 y 3	40
5.2.2.1	Búsqueda de un Substituto para el Fasciolicida Alfa	40
5.2.3	Pruebas con Diferentes Excipientes	45
5.3	Valoración del Fasciolicida Alfa en la Suspensión	
5.3.1	Reactivos	49
5.3.2	Instrumentación	49
5.3.3	Equipo	49



---

5.3.4	Condiciones Cromatográficas	50
5.3.5	Curva de Calibración	50
5.3.6	Extracción del Fasciolicida Alfa de la Suspensión	51
6.	RESULTADOS	
6.1	Síntesis	52
6.2	Desarrollo de la Forma Farmacéutica	54
6.3	Valoración del Fasciolicida Alfa en la Suspensión	56
7.	DISCUSIÓN	58
8.	CONCLUSIONES	62
9.	APÉNDICE	
9.1	Procedimientos Normalizados de Operación	
9.1.1	PNO TF-A-001	63
9.1.2	PNO TF-A-002	68
9.1.3	PNO TF-A-003	74
9.2	Espectros	
9.2.1	4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (5)	79
9.2.2	4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (6)	82
9.2.3	5-Cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (7)	85
9.2.4	5-Cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (8)	88
10.	BIBLIOGRAFÍA	91

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Fasciola hepatica</i>	5
Figura 2.	Ciclo de vida de la <i>F. hepatica</i>	7
Figura 3.	Distribución geográfica de la <i>F. hepatica</i>	8

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Eficiencia comparativa de diferentes fármacos vs <i>F. hepatica</i>	12
Tabla 2.	Solubilidad del fasciolicida alfa a 37 °C	15
Tabla 3.	Resultados para las pruebas <i>in vitro</i> del compuesto alfa vs metacercarias de <i>F. hepatica</i>	16
Tabla 4.	Resultados obtenidos para el estudio de actividad del compuesto alfa vs <i>F. hepatica</i> en ovinos	16
Tabla 5.	Valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos para el fasciolicida alfa en ovinos	17
Tabla 6.	Valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos para el fasciolicida alfa en bovinos	18
Tabla 7.	Reología de los posibles sustitutos del fasciolicida alfa	41
Tabla 8.	Constantes físicas y rendimientos	52
Tabla 9.	Determinaciones organolépticas y fisicoquímicas de las formulaciones 1, 2 y 3	54
Tabla 10.	Determinaciones organolépticas y fisicoquímicas de las formulaciones 4, 5 y 6	54
Tabla 11.	Resultados de la curva de calibración (triplicado) del fasciolicida alfa	56
Tabla 12.	Datos para la curva de calibración	56
Tabla 13.	Datos de las extracciones realizadas	57

---

---

**LISTA DE GRÁFICAS**

<b>Gráfica 1.</b> Curvas de energía potencial <i>vs</i> distancia para las partículas de una suspensión	24
<b>Gráfica 2.</b> Distribución del tamaño de partícula para el mebendazol "A"	41
<b>Gráfica 3.</b> Distribución del tamaño de partícula para el metronidazol	42
<b>Gráfica 4.</b> Distribución del tamaño de partícula para el fasciolicida alfa	43
<b>Gráfica 5.</b> Curva de calibración promedio para la cuantificación del fasciolicida alfa	57

---

---

## RESUMEN

En el presente trabajo se integran conocimientos para la preparación de un medicamento y la valoración del principio activo. Para su mejor comprensión, el estudio realizado se describe en tres partes.

En la primera se realizó la síntesis a escala (150 g) del 5-cloro-2-metil-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (fasciolicida alfa) según una ruta propuesta previamente. Los compuestos intermedios fueron caracterizados por sus constantes físicas, espectroscópicas de IR, RMN <sup>1</sup>H y espectrometría de masas, las cuales correspondieron con las estructuras esperadas.

La segunda etapa consistió en el desarrollo de una forma farmacéutica adecuada para la dosificación del fármaco al ganado, así como el desarrollo del Procedimiento Normalizado de Operación (PNO) de manufactura de dicha forma farmacéutica. Se tomó la decisión de que fuera una suspensión. Entre los distintos excipientes empleados se encuentran algunos polímeros naturales y semisintéticos como la pectina, carbopol (974P y 971P), carboximetilcelulosa (alta, media y baja viscosidad) y arcillas naturales como el caolín. Las distintas formulaciones preparadas fueron caracterizadas por sus propiedades organolépticas y fisicoquímicas (pH, viscosidad y densidad); además de la observación de su estabilidad física. La formulación que obtuvo los mejores resultados se fabricó bajo el PNO TF-A-002-Manufactura (ver apéndice-PNO's).

Por último, la tercera parte del trabajo fue el desarrollo de un método para la extracción del principio activo de la suspensión y su cuantificación por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El compuesto alfa se aisló de la suspensión con acetato de etilo a pH 8; la concentración se calculó al extrapolar el valor de la absorbancia en una curva promedio; obteniendo 98 % del contenido esperado.

---

---

## INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una zoonosis parasitaria causada por el trematodo *Fasciola hepatica*, es responsable de grandes pérdidas económicas en todo el mundo y aunque su distribución es cosmopolita, se encuentra preferentemente en los países con climas tropicales y subtropicales. Esta zoonosis se relaciona con la falta de condiciones sanitarias en los criaderos y granjas, lo cual se presenta con mucha frecuencia en los países en vías de desarrollo como es el caso de México. Cuando este parásito se encuentra ya alojado en el hígado del hospedero (habitualmente ganado bovino y ovino), causa trastornos digestivos. Esto conlleva a una disminución o falta de aumento de peso en animales en desarrollo y de engorda, con la consecuente baja producción de carne. También se reduce la producción de leche y lana, lo que puede repercutir en la salud de las crías; además de que el índice de abortos es mayor y puede conducir a infertilidad precoz.<sup>1,2,11-13.</sup>

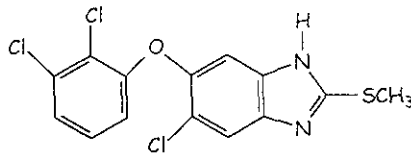
El control de la infección puede lograrse:

1) Atacando al caracol del género *Limnaea* (intermediario en el ciclo biológico del parásito), al desecar aguas estancadas o instalar sistemas de drenaje adecuado en las zonas afectadas, o bien, por el uso de molusquicidas.

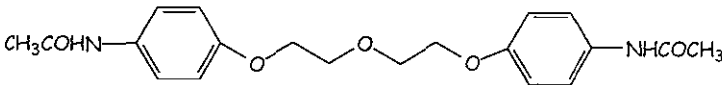
2) Por medio de antihelmínticos en el tratamiento de los animales.

El control del caracol es bastante difícil y costoso, además de que algunos molusquicidas son letales para otro tipo de animales; es por ello que la quimioterapia es el procedimiento elegido para el control y/o eliminación del trematodo *F. hepatica* en las zonas endémicas.<sup>1,11,12</sup>

La mayoría de los fasciolicidas disponibles en la actualidad son eficaces contra las formas maduras del parásito; sin embargo, solamente el triclabendazol (Fasinex®) y el diamfenetide (Coriban®) han demostrado tener eficacia contra los estadios juveniles del parásito.<sup>10-13,17</sup>



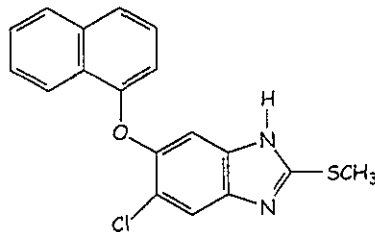
TRICLABENDAZOL



DIAMFENETIDA

En el caso del Coriban® se ha reportado que su eficiencia decrece a medida que el parásito alcanza su madurez.<sup>12,31</sup> Para el triclabendazol, el fasciolicida más ampliamente usado para el tratamiento de esta infección, se han reportado casos de *F. hepatica* resistente a este principio activo en ganado ovino y bovino.<sup>32,33</sup>

Con el objeto de estudiar más moléculas que puedan convertirse en una alternativa terapéutica para esta zoonosis, se diseñó el 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (fasciolicida alfa)\* que hasta el momento ha mostrado resultados prometedores contra los estadios juveniles y adultos de la *F. hepatica* en las pruebas tanto *in vitro* e *in vivo*, como en las pruebas farmacocinéticas



FASCIOLICIDA ALFA

\*Grupos de investigación del Departamento de Farmacia (Lab 122) de la Facultad de Química y el Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo tiene como objeto llevar a cabo el escalamiento de la síntesis del fasciolicida alfa y desarrollar una forma de dosificación adecuada que sea fabricada en forma consistente (bajo PNO's) y con ello poder continuar con las pruebas de esta nueva molécula, entre otras, las toxicológicas.

### 3 ANTECEDENTES

#### 3.1 Fasciolosis

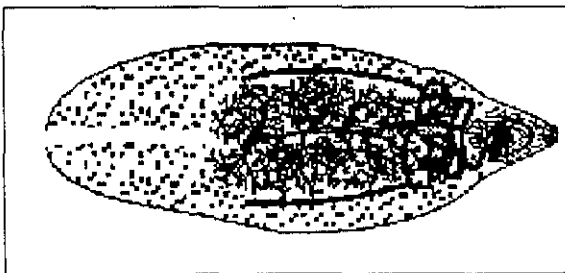
##### 3.1.1 Definición

La fasciolosis es una zoonosis parasitaria causada por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) y *F. gigantica* (Cobbold, 1856). Estos trematodos producen cuadros sistémicos y fenómenos alérgicos durante su migración en el huésped definitivo (mamíferos herbívoros y el hombre), así como lesiones, de leves a graves, en conductos biliares.<sup>2</sup> Algunos otros nombres de la fasciolosis son: Distomatosis hepática, Hígado podrido, Mal de botella, Palomilla y Conchuela del hígado picado.<sup>1</sup>

##### 3.1.2 El Agente: *F. hepatica*

La *F. hepatica* (ver figura 1) es un gusano hermafrodita que mide hasta 3 cm de longitud y cerca de 1.5 de ancho, es de color café blanquecino, su tegumento está formado por una capa citoplasmática continua sin límites celulares y cuyos núcleos se localizan por debajo de la capa muscular superficial. La superficie del tegumento tiene numerosas espinas. Tienen una forma característica debido a la presencia en el extremo anterior de un cono cefálico; ligeramente por encima y debajo de éste se encuentran las ventosas oral y ventral (acetábulo), esta última muy prominente le sirve como órgano de fijación. Debajo de la ventosa ventral se abre el poro genital. El tiempo de vida de la *F. hepatica* oscila entre 3 y 5 años<sup>2</sup>

Figura 1. *Fasciola hepatica*.<sup>2</sup>





### 3.1.3 Ciclo Biológico

En el ciclo de vida de la *F. hepatica* (ver figura 2), el hombre se infesta al ingerir berros, lechuga, alfalfa, etc.; los cuales llevan adheridas las metacercarias, que son la forma infestante del parásito. También puede infestarse al beber agua de manantiales y posiblemente al consumir hígados semicrudos de animales infestados con formas juveniles de la fasciola en migración.<sup>3,4</sup>

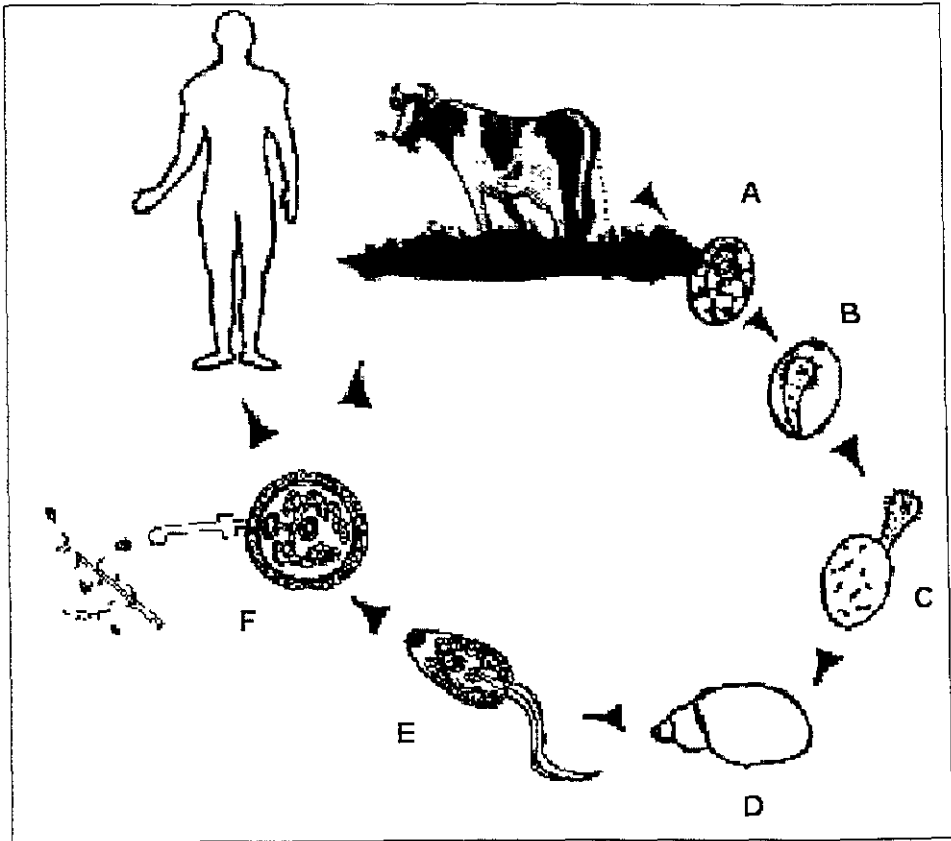
Una vez en el animal infestado la fasciola se autofecunda y produce huevecillos que son expulsados en las heces fecales llegando al agua y madurando en una o dos semanas, dentro de ellos una larva ciliada, el miracidio, empuja el opérculo y sale al exterior donde se moviliza activamente en busca del huésped intermediario. Este intermediario es un caracol pulmonado de agua dulce del género *Limnaea*<sup>\*</sup>, al que invade utilizando acciones mecánicas e histolíticas; ya en su interior se convierte en esporoquiste; el que por el principio de poliembrionia (de un solo embrión se derivan muchos) produce la primera generación de redias, aproximadamente 20 días después. Una semana después las redias producen una segunda generación, que al transformarse en cercarias abandonan el caracol y maduran en el agua (un miracidio se transforma en alrededor de 500 cercarias). Las cercarias pierden la cola, se redondean y enquistan en plantas acuáticas y en material inerte como los plásticos y el cartón, transformándose en metacercarias (forma infestante para los animales herbívoros y el hombre).

Cuando las metacercarias son ingeridas por el hombre, al llegar al duodeno se desenquistan y se convierten en formas juveniles o distomas, las cuales atraviesan la pared celular hasta llegar a la cavidad peritoneal. De esta última migran hasta alcanzar el hígado, perforan la cápsula hepática, se introducen y continúan su camino por el parénquima hepático causando a veces serios daños, hasta penetrar en los conductos biliares en donde se convierten en adultos unos dos o tres meses más tarde.

<sup>\*</sup>De acuerdo con Euzebý -1971- se escribe *Limnaea* y no *Lymnaea*, ya que el origen griego de la palabra es *Limnaios* y no *Lymnaios*

Algunas formas juveniles se extravían durante la migración y se alojan en el peritoneo, donde suelen causar cuadros muy graves. También pueden parasitar en forma errática otras estructuras como el páncreas, pulmón y tejido subcutáneo.<sup>1</sup>

Figura 2. Ciclo de vida de la *F. hepatica*.<sup>2</sup>

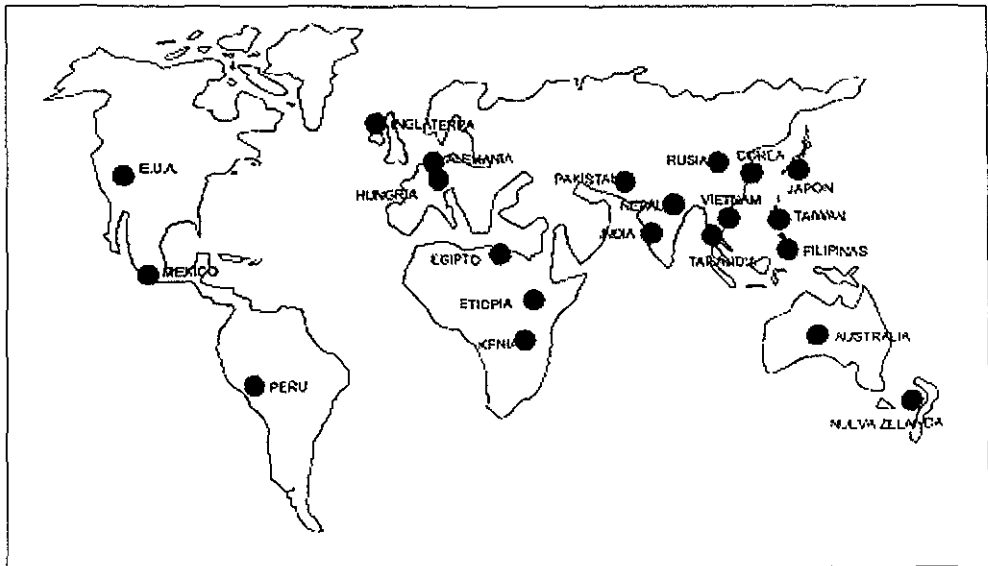


A: Huevos en heces; B: Huevos en medio hídrico; C: Miracidio; D: Caracol huésped (El esporoquiste y las redias se forman dentro del caracol); E: Cercarias; F: Metacercarias.

### 3.1.4 Distribución

La fasciolosis es de distribución cosmopolita (ver figura 3) y prevalece en los países criadores de ovejas y bovinos que constituyen los huéspedes habituales, aunque puede encontrarse también en una gran variedad de herbívoros, particularmente rumiantes: bisontes y búfalos, en equinos, caprinos, cerdos, elefantes, venados, entre otros. La infestación en el hombre por fasciolosis ha sido observada en el Norte de Asia, Norte de África, Australia y Europa; siendo un problema grave en lugares como: Brasil, Paraguay, Perú, Venezuela, Chile, Argentina, Colombia, México, Nueva Zelanda, Pakistan, China, Indonesia y Japón, entre otros.<sup>2,11-13</sup>

Figura 3. Distribución geográfica de la *F. hepatica*.<sup>2</sup>



### 3.1.5 Pérdidas Económicas

La importancia de las pérdidas causadas por la fasciolosis depende de la intensidad de la infestación, se pueden dividir en directas e indirectas. Las directas son aquéllas en que la enfermedad aparece bruscamente ocasionando muertes. Estas pérdidas ya considerables pueden ser superadas por las indirectas.

Los animales con fasciolosis crónicas frecuentemente no presentan signos muy marcados que hagan sospechar al dueño de un problema importante de los trastornos digestivos más o menos pronunciados.

Las alteraciones hepáticas conducen, según la intensidad de la enfermedad, a una disminución del peso o a una falta de aumento de peso en animales en desarrollo y en engorda; disminuye la producción de leche y lana. Algunos trabajos han demostrado que la producción de leche puede disminuir entre 5% en vacas con fasciolosis crónica, hasta 70 ó 100% en animales caquéuticos (extremo adelgazamiento) y mermar hasta en un 39% la producción de lana. La infertilidad precoz y los abortos retrasan el intervalo entre parto y parto. La producción insuficiente de leche repercute también en la cría, ya que retarda el crecimiento entre 30 y 50% y aumenta la susceptibilidad a otras enfermedades infecciosas y parasitarias. Hay que agregar a las pérdidas económicas, mayor consumo de alimento, debido a la deficiente digestión y el decomiso del hígado en los mataderos.<sup>1,11-13</sup>

La fasciolosis, es responsable de cuantiosas pérdidas económicas en la producción ganadera en todo el mundo, además de que el hombre puede verse infestado también por este parásito.<sup>12</sup>

### 3.1.6 Medidas de Prevención-Lucha-Control

Para atacar a la fasciolosis en el ámbito humano se debe realizar el diagnóstico adecuado de la enfermedad en los habitantes de la zona de riesgo, así como organización de sistemas de reporte de casos. Una vez que se detectan individuos con fasciolosis, tratarlos y darles seguimiento mediante diagnósticos de control, para poder con ello evaluar la efectividad de las medidas tomadas. También es importante vigilar el transporte y manejo de vegetales acuáticos y semiacuáticos a los centros de consumo, para evitar que contengan a las formas infestantes de la *F. hepatica*.

Para evitar la propagación y/o llegada de la enfermedad en las granjas, se debe contar con abrevaderos libres del caracol intermediario, llevar a cabo el diagnóstico adecuado y hacer un reporte de casos. En cuanto al tratamiento a seguir, se recomienda idealmente realizar cuatro por año; sin embargo, si esto no es posible al menos debe hacerse uno -finalizando las lluvias-. Al igual que en los humanos, se recomienda llevar a cabo un diagnóstico de control a los animales tratados para evaluar la evolución de la endemia y la efectividad de las medidas de control. En las aduanas se debe tener un control de los animales importados.<sup>9</sup>

Otra medida que se puede adoptar para hacer frente a la fasciolosis, es la lucha contra el huésped intermediario (caracol del género *Limnaea*), la cual se basa en actividades como la desecación de agua estancada y el uso de sistemas de drenaje adecuados en las zonas infestadas. Otra opción es el empleo de molusquicidas como el sulfato de cobre (considerado como el molusquicida clásico), pentaclorofenato de sodio (para tratamiento de aguas estancadas), cianuro de calcio (este producto se usa como fertilizante), cloruro de cobre y bromuro de *N*-hexadecil-*N,N,N*-trimetilamonio.<sup>1</sup> El control del caracol es bastante difícil y costoso de llevar a cabo, además de que los compuestos de cobre son letales para otro tipo de animales; es por ello que la quimioterapia (uso de compuestos químicos para el tratamiento de alguna enfermedad) es el procedimiento elegido para el control de las zonas endémicas<sup>1,11,12</sup>

### 3.1.7 Tratamiento

El uso de fármacos es la medida más frecuentemente empleada para el tratamiento de la fasciolosis, los de uso común en la actualidad (o en un pasado reciente) se clasifican en 5 principales grupos (tabla 1):<sup>17</sup>

- Fenoles halogenados: Bitionol (Bitin, Actamer), hexaclorofeno (anteriormente llamado Bilevon -ahora es obsoleto-), niclofolan (Bilevon -en la actualidad-), notroxilin (Trodat).
- Salicilanilidas: Brotianide (Dirian), closantel (Flukiver, Seponver, Supaverm, Cosicare), oxiclozanida (Nilzan, Zani), rafoxanida (Flukanide, Ranizole).
- Bencimidazoles: Aibendazol (Valvazen), mebendazol (Telmin, Vermox, Supraverm), triclabendazol (Fasinex), Luxabendazol (Fluxacur).
- Sulfonamidas: Clorsulon (Curatrem C, Ivomec Plus).
- Fenoxialcanos: Diamfenetide (Coriban).

Tabla 1. Eficiencia comparativa de diferentes fármacos vs *F. hepatica*.<sup>17</sup>

Fármaco	Ruta de Administración	Dosis Recomendada (mg/Kg)		Dosis Máxima Tolerada (mg/Kg)	Índice de seguridad para ovejas a la dosis recomendada	Edad mínima del parásito en la cual el fármaco presenta una eficiencia ≥90% (semanas)	
		Ovejas	Vacas			Ovejas	Vacas
Bitionol	Oral	75	30	75	1	>12	>12
Hexaclorofeno	Oral	15	20	40	2.6	12	12
Niclofolan	Oral	4	3	12	3.0	12	>12
Nitroxilin	Subcutánea	10	10	40	4.0	8	10
Brotianide	Oral	5.6	NR	27	4.8	12	NR
Closantel	Oral	7.5-10	NR	40	4.0	8-6	NR
Oxiclоразanida	Oral	15	3	60	4.0	12	>14
Rafoxanida	Oral	7.5	13-16	45	6.0	6	>12
Albendazol	Oral	4.75	7.5	30	8	>12	12
Triclabendazol	Oral	10	12	200	20-40	1	8
Clorsulon	Oral	NR	7	100	5	NR	1
Diamfenetide	Oral	80-120	100	400	3.3-5.0	1 día-6 semanas	1 día-7 semanas

NR: No Reportado.

### 3.1.8 Triclabendazol

El triclabendazol (TCBZ), 5-cloro-6-(2,3-diclorofenoxi)-2-(metilitio)-1*H*-bencimidazol cuyo nombre comercial es FASINEX® de Ciba Geigy (1981), es un compuesto que posee una alta eficiencia contra los diferentes estadios de la *F. hepatica* y es bien tolerado por el hospedero.<sup>12,13</sup> El TCBZ ha presentado una actividad del 99-100% contra la *F. hepatica*, la dosis usualmente empleada para su eliminación tanto en su forma adulta como en la inmadura es de 5-10 mg/Kg en borregos y cabras, y de 12 mg/Kg en ganado vacuno.<sup>10,11</sup>

El triclabendazol ha sido el fármaco más ampliamente usado debido a que presenta ventajas sobre otros fasciolocidas, por ejemplo, a dosis de 5 y 10 mg/Kg ha resultado ser ligeramente más efectivo contra la forma adulta de la *F. hepatica* que el niclofolan a dosis de 3 ó 3.75 mg/Kg; además, este último, al parecer presentó signos de toxicidad en una de las pruebas, mientras que el TCBZ fue bien tolerado por ovejas y cabras<sup>10,12</sup>.

A pesar de la alta eficiencia que el TCBZ presenta contra la *F. hepatica*, también se ha reportado su baja actividad contra los nematodos y cestodos, parásitos que son típicamente sensibles a los bencimidazoles. El hecho de que el TCBZ no tenga actividad nematocida, sugiere que éste actúa de manera diferente a los otros bencimidazoles antihelmínticos.<sup>5</sup>

Después de administrarse el TCBZ por vía oral a los diferentes animales en estudio (ovejas, cabras, vacas, caballos, dromedarios y búfalos), solamente se detectan en plasma los metabolitos sulfóxido de triclabendazol (TCBZ-SO) y sulfona de triclabendazol (TCBZ-SO<sub>2</sub>). Se ha encontrado también que el TCBZ-SO es farmacológicamente activo.<sup>5</sup>



### 3.1.9 Fasciolicida Alfa

#### 3.1.9.1 Diseño

El diseño del fasciolicida alfa se llevó a cabo en la Facultad de Química, como parte de un proyecto amplio denominado: "*Síntesis y evaluación biológica de nuevos bencimidazoles*". Este proyecto tiene la finalidad de obtener información sobre los requerimientos estructurales de los bencimidazoles para ejercer su acción antihelmíntica y antiprotozoaria. Así como investigar el mecanismo por el cual lo realizan, pretendiendo encontrar relaciones cuantitativas entre la estructura y la actividad, para asentar las bases del diseño racional de nuevas moléculas con actividad biológica, tanto para su uso en la medicina veterinaria como en la humana; además que sean de fácil preparación y bajo costo.

Un conjunto de compuestos tomó como base al triclabendazol, que hasta la fecha es el fármaco de elección en el tratamiento de la fasciolosis y entre otros fueron sintetizados el 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (compuesto ALFA) y el 5-cloro-2-metiltio-6-(2-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (compuesto BETA), cuya variación con respecto al triclabendazol es el sustituyente en la posición 5. Esta variación se realizó con la finalidad de encontrar un isómero del grupo 2,3-diclorofenoxi del triclabendazol en dicha posición, que pudiera ejercer un efecto similar al del grupo original.

Después de llevar a cabo las pruebas de actividad biológica -las cuales se discutirán posteriormente- se encontró que el compuesto denominado ALFA tuvo actividad contra la *F. hepatica* en las fases adulta e inmadura de su desarrollo. Esta es una de las principales características que han llevado al triclabendazol a ser el fármaco de elección contra la fasciolosis.

### 3.1.9.2 Solubilidad

Uno de los puntos más importantes al momento de desarrollar una forma farmacéutica de un nuevo compuesto es su solubilidad, en el caso del fasciolicida alfa ésta ya se había determinado (método de Yalkowski)<sup>5</sup>. En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos para la prueba de solubilidad, de ésta se puede apreciar la hidrofobicidad que presenta nuestro compuesto.

Tabla 2. Solubilidad del fasciolicida alfa 37 °C.

Disolvente	Solubilidad [mg/mL]
Solución amortiguadora de fosfatos pH=7.4	>0.00002
Solución amortiguadora de fosfatos pH=6.0	0.00047
Solución amortiguadora de fosfatos pH=2.2	0.0038
Solución amortiguadora de fosfatos pH=1.3	0.0062
NaOH 0.1N	0.00032
HCl 0.1N	0.010
Acetonitrilo	0.009
Acetona	0.038
Propilenglicol	0.041
Hexano	0.062
Metanol	0.10
Dimetilsulfóxido	0.21

### 3.1.9.3 Estudios de Actividad

A continuación se hará referencia a algunos estudios realizados hasta el momento del fasciolicida alfa:

La eficiencia *in vitro* (ver tabla 3) se evaluó a diferentes concentraciones, utilizando metacercarias de *F. hepatica* desenquistadas. La evaluación tomó como parámetro la supervivencia de los helmintos después de cuatro días de exposición, calculando el porcentaje de eficiencia en comparación con un control positivo (metacercarias sin el compuesto alfa).<sup>6</sup>

Tabla 3. Resultados para las pruebas *in vitro* del compuesto alfa vs metacercarias de *F. hepatica*.

Concentración [mg/L]	Eficiencia %
0.37	0
1.11	0
3.33	77.5
10	100
50	100

El primer estudio *in vivo* se llevó a cabo en tres grupos de ovinos de 9 individuos cada uno, dos de ellos fueron tratados con el producto alfa a dos diferentes concentraciones (por vía oral) y el otro sirvió como control. Los resultados mostraron una eficiencia de 80.6 % para la dosis de 10 mg/kg y 86.9% para la de 15 mg/Kg. Con este estudio el compuesto alfa mostró una muy promisoría actividad como fasciolicida.<sup>6</sup>

Un estudio posterior se llevó a cabo contra las fasciolas de 4 y 8 semanas en 50 ovinos criollos (ver tabla 4), a los cuales se les administraron oralmente 200 metacercarias de la *F. hepatica*. Pasadas 4 semanas los animales fueron reinfestados con 200 metacercarias; y después de 8 semanas de la infestación inicial los animales se dividieron al azar en 5 grupos de 10 individuos cada uno. A cuatro grupos se les trató con 5, 15, 22.2 y 30 mg/Kg del compuesto alfa y el quinto grupo fungió como control sin tratamiento. Dos días después de la administración del compuesto alfa, los animales fueron sacrificados con el fin de evaluar la actividad, mediante el conteo de las fasciolas en el hígado para la obtener el porcentaje de reducción.<sup>7</sup>

Tabla 4. Resultados obtenidos para el estudio de actividad del compuesto alfa vs *F. hepatica* en ovinos.

Dosis [mg/kg]	% de Eficiencia		
	4 semanas	8 semanas	Promedio
10	82.2	81.7	82.0
15	87.2	88.1	87.6
22.2	90.8	87.2	89.2
30	94.3	90.0	92.4

#### 1.9.4 Estudios Farmacocinéticos en Ovinos

Con la finalidad de conocer el comportamiento (movimiento y condiciones que lo afectan) del fasciolicida alfa en el organismo de los animales, se realizó un estudio de la farmacocinética en ovinos (ver tabla 5) usando una dosis de 12 mg/kg administrada por vía oral. El experimento se realizó monitoreando, por medio de HPLC (High Performance Liquid Chromatography), las concentraciones del compuesto alfa y su metabolito sulfóxido en plasma a diferentes tiempos. El compuesto alfa no fue detectado como tal, lo que significa que sufrió un metabolismo extenso. Sin embargo se encontró que el metabolito sulfóxido, presentó una farmacocinética descrita por el Modelo Abierto de Dos Compartimentos (MADC) cuyos parámetros se presentan a continuación.<sup>8</sup>

Tabla 5. Valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos para el fasciolicida alfa en ovinos.

Parámetros farmacocinéticos	Valores medios
$t_{\frac{1}{2}}$ absorción	6.17 h
$t_{\frac{1}{2}}$ eliminación	18.9 h
Tmax	11.4 h
Cmax	8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$
ABC	238.4 $\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$
Vol. de distribución	58.6 L
Depuración	68.8 mL/min.

$t_{\frac{1}{2}}$ : Tiempo de vida media, Cmax: Concentración máxima alcanzada

Tmax: Tiempo requerido para alcanzar Cmax;

ABC: Area bajo la curva

### 3.1.9.5 Estudios Farmacocinéticos en Bovinos

Se llevó a cabo en 7 bovinos (3 machos y 4 hembras) con un peso de entre 186 y 254 Kg, y se les administró una dosis oral de 12 mg/kg. La metodología fue similar a la que se siguió al llevar a cabo la farmacocinética en ovinos.

En este estudio tampoco fue posible detectar al compuesto alfa; sin embargo, fueron cuantificadas (HPLC) las concentraciones plasmáticas de los metabolitos sulfóxido ( $\alpha$ -SO) y sulfona ( $\alpha$ -SO<sub>2</sub>).<sup>5</sup> En la tabla 6 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6. Valores de los parámetros farmacocinéticos obtenidos para el fasciolicida alfa en bovinos.

Parámetros farmacocinéticos	Sulfóxido (valores medios $\pm$ D.E.)	Sulfona (valores medios $\pm$ D.E)
t <sub>½</sub> aparición	9.43 $\pm$ 5.10 h	26.26 $\pm$ 2.73 h
t <sub>½</sub> eliminación	25.82 $\pm$ 2.35 h	34.79 $\pm$ 8.36 h
Tmax	33.43 $\pm$ 4.37h	63.43 $\pm$ 5.42 h
Cmax	5.01 $\pm$ 1.02 $\mu$ g/mL	10.19 $\pm$ 1.90 $\mu$ g/mL
ABC <sub>0-<math>\tau</math></sub>	238.63 $\pm$ 42.58 $\mu$ g*h/mL	735.44 $\pm$ 176.53 $\mu$ g*h/mL
ABC <sub>0-<math>\infty</math></sub>	249.13 $\pm$ 43.13 $\mu$ g*h/mL	855.89 $\pm$ 212.55 $\mu$ g*h/mL

D.E.: Desviación estándar.

## 3.2 Suspensiones

Al desarrollar un medicamento debe elegirse una forma farmacéutica adecuada para su administración. Las suspensiones pueden ser una opción para resolver el problema de la administración de fármacos poco solubles, éstas deben ser lo suficientemente viscosas para mantener las partículas del principio activo separadas unas de otras, pero también lo suficientemente fluidas para permitir su fácil administración. La viscosidad requerida depende de la tendencia del principio activo a sedimentar, que a su vez depende del tamaño de partícula y de la densidad del polvo.<sup>25</sup>

### 3.2.1 Definición

Una suspensión es un sistema heterogéneo consistente en dos fases, una es continua o externa que es generalmente un líquido o semisólido y la otra es dispersa o interna que es insoluble en la primera.<sup>15</sup>

La definición anterior es muy general ya que según ésta los geles y las lociones se podrían clasificar como suspensiones, es por ello que existe la necesidad de una terminología más específica. Para los preparados farmacéuticos que se conocen como suspensiones se debe hacer hincapié en que es un sólido disperso en un líquido, y que el estado de subdivisión del mismo tiene como límite inferior aproximadamente de 0.1  $\mu\text{m}$ , hasta partículas que decantan o sedimentan durante el reposo.<sup>24</sup>

Una suspensión aceptable debe poseer ciertas cualidades deseables, por ejemplo, que la fase dispersa no debe sedimentar rápidamente, las partículas que sedimentan no han de formar un sólido difícil de resuspender ("cake o torta") con agitación y se debe formar nuevamente una mezcla uniforme y homogénea a la vista. La suspensión no debe ser demasiado viscosa para que pueda ser vertida fácilmente y no se dificulte su administración.<sup>19,24</sup>

---

La mayoría de las suspensiones se llegan a separar con el tiempo; sin embargo, el objetivo principal al desarrollar una formulación no es evitar esta sedimentación, sino bajar al máximo su velocidad de sedimentación, permitir la fácil resuspensión del sólido y evitar que se aglomeren las partículas formando "cake".<sup>15</sup>

Además de las propiedades físicas adecuadas, las suspensiones han de contar con óptimas propiedades químicas y farmacológicas, para lo cual el tamaño de partícula, el área superficial específica, la inhibición del crecimiento de cristales y los cambios polimórficos tienen una importancia especial.<sup>19</sup>

Finalmente es deseable que el producto contenga ingredientes fáciles de adquirir, que puedan incorporarse a la mezcla con cierta facilidad y que pueda ser preparado usando métodos y equipos estandarizados.<sup>19</sup>

### 3.2.2 Componentes

Los principales componentes de una suspensión son el principio activo (por lo gral. compuestos hidrófobos), surfactantes y los agentes suspensoros. Los surfactantes se usan para reducir la tensión superficial entre las partículas sólidas y el vehículo, lo que permite el desplazamiento de aire de la superficie del material hidrófobo, para que el líquido (por lo general agua) que rodea a las partículas las humecte y se forme una dispersión adecuada. Si se decide usar un surfactante hay que tener en cuenta que al reducir la tensión superficial entre las partículas se promueve la defloculación.<sup>19,24</sup>

Los agentes viscosantes actúan como coloides protectores, que a concentraciones altas modifican considerablemente la viscosidad y reducen la velocidad de sedimentación de las partículas defloculadas, o bien, proporcionan estabilidad a una suspensión floculada. La elección de un agente viscosante apropiado depende de la finalidad de uso del producto.

En las suspensiones de administración oral la fase externa generalmente consiste en agua; sin embargo, puede considerarse el uso de otros líquidos polares como el alcohol (EtOH) o la glicerina para controlar la solubilidad, estabilidad y sabor. Además deben incorporarse agentes conservadores adecuados para reducir el riesgo de contaminación microbiana.<sup>24</sup>

### 3.2.3 Ventajas y Desventajas

El desarrollo de una suspensión como forma de dosificación, constituye una de las vías más usadas, esto debido a que permite la administración de fármacos que presentan baja solubilidad en agua. Entre las ventajas de estas formas farmacéuticas se encuentran la flexibilidad en la dosificación -puede ajustarse según las necesidades del paciente-, facilidad de administración, buena estabilidad química -por no tener al principio activo en solución-, eficiencia farmacológica, además de ser de fácil manufactura en comparación con otras formas farmacéuticas.<sup>16,24</sup>

Entre las desventajas que presentan este tipo de formas farmacéuticas destacan la dificultad para obtener la uniformidad de contenido, siendo necesaria la agitación previa a la administración; la formación del sedimento provoca un aspecto desagradable, lo que obliga a usar contenedores opacos y si no se cuenta con un dosificador adecuado puede presentarse variación entre las distintas cantidades administradas durante el tratamiento.

### 3.2.4 Estabilidad Física

Las suspensiones son relativamente fáciles de preparar; sin embargo, los problemas se presentan en el momento de monitorear su estabilidad física. Para propósitos farmacéuticos, la estabilidad física de una suspensión puede ser definida como la condición en la que las partículas no se agregan y permanecen uniformemente distribuidas en el medio de dispersión. Como rara vez ocurre esto, se ha agregado una condición más, que dice que en caso de sedimentar, las partículas deben resuspenderse fácilmente por agitación moderada.<sup>19,26</sup>



Entre las pruebas para el control de calidad referentes a la estabilidad física de las suspensiones se destacan la sedimentación, apariencia, olor y vertibilidad; las cuales, deben ser verificadas periódicamente.<sup>25</sup> La estabilidad física puede establecerse mediante la determinación de la sedimentación, viscosidad, densidad y realización de pruebas microbiológicas.<sup>24</sup>

### **3.2.5 Aspectos Físicoquímicos en el Desarrollo de una Suspensión**

#### **3.2.5.1 Propiedades Interfaciales**

Como ya se mencionó, una suspensión consta de dos fases, una de ellas formada por un sólido insoluble y la otra por un líquido que actúa como fase externa o continua, de la interacción de éstas depende la estabilidad de una suspensión.

El aumento del área superficial de las partículas insolubles como resultado del decremento del diámetro, está asociado a un aumento en la energía libre superficial; esto trae como resultado un sistema termodinámicamente inestable. Lo que significa que las partículas mientras más pequeñas, tienen una mayor energía y tienden a reagruparse de manera que decrezca la energía libre superficial.

Las partículas de una suspensión líquida pueden formar los llamados flóculos (conglomerados ligeros y esponjosos que están unidos por débiles fuerzas de van der Waals); o bien, bajo ciertas condiciones (p.e. un "cake" compacto) las partículas pueden estar adheridas por fuertes fuerzas que forman los llamados agregados. La formación de cualquiera de los dos aglomerados (flóculos o agregados), es considerada como una medida de la tendencia del sistema a alcanzar un estado termodinámicamente estable.

El incremento en la energía libre superficial del sistema debido al aumento del área superficial de la fase dispersa, como consecuencia de la división del sólido se expresa en la ecuación siguiente:

$$\Delta G = \gamma_{SL} * \Delta A$$

En donde  $\Delta G$  es la energía libre superficial,  $\Delta A$  el área superficial total y  $\gamma_{SL}$  es la tensión superficial entre el medio líquido y las partículas sólidas.

Para que el sistema se acerque al equilibrio ( $\Delta G=0$ ) existen dos posibilidades, una es reducir la tensión superficial y la otra es disminuir el área interfacial; esta última conduce a la formación de agregados o flóculos. La tensión superficial puede ser disminuida por un surfactante; sin embargo, una suspensión de partículas insolubles posee un valor finito positivo para la tensión superficial.

Las fuerzas de repulsión y atracción de la superficie de las partículas afectan el grado de floculación y aglomeración en una suspensión. Las fuerzas de atracción son del tipo van der Waals; mientras que las de repulsión surgen de la interacción de la doble capa eléctrica que rodea a cada partícula.

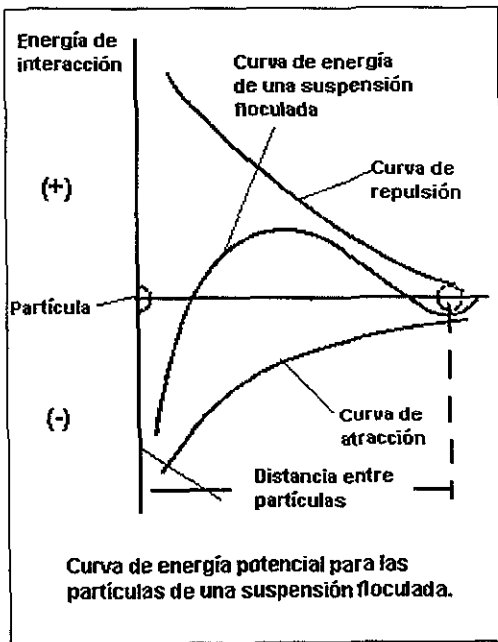
La energía potencial entre dos partículas es función de la distancia que las separa, en la gráfica 1 se muestra esta relación y en ella se puede observar que cuando la energía de repulsión es alta, la barrera energética también lo es, evitando la colisión de las partículas; quedando así el sistema defloculado. Sin embargo con el paso del tiempo ocurre la sedimentación, en la que las partículas más pequeñas (lentas para sedimentar) son presionadas por las más grandes; rompiendo así la barrera energética. Al romperse esta barrera las partículas tienen un contacto cercano y forman un paquete compacto, conformado por pequeñas partículas que llenan los espacios generados por las más grandes. Ahora bien, para resuspender estas partículas se tiene que vencer nuevamente una gran

barrera energética, lo que no es fácil por agitación ya que las partículas están muy fuertemente unidas unas con otras formando el llamado "cake".

Cuando las partículas están floculadas, la barrera energética es grande y no puede ser vencida, así las partículas residen en el segundo mínimo de energía (gráfica 1), el cual está a una distancia mínima de aproximadamente 1000 a 2000 Å, esta distancia es suficiente para formar flóculos.

En pocas palabras las partículas floculadas están débilmente unidas, sedimentan rápido, no forman "cake" y son fácilmente resuspendidas, mientras que las partículas defloculadas sedimentan lentamente y eventualmente forman un sedimento en el cual la agregación ocurre y como resultado se forma un fuerte "cake" que es muy difícil de resuspender.<sup>19</sup>

Gráfica 1. Curvas de energía potencial vs distancia para las partículas de una suspensión.<sup>19</sup>



### 3.2.5.2 Identificación de Sistemas Floculados y Defloculados

Para poder identificar una suspensión floculada o defloculada de una manera sencilla y rápida, se puede hacer el análisis del sobrenadante que aparece en las primeras etapas de la sedimentación. En este método se establece que en un sistema floculado el líquido que está sobre el sedimento es claro, debido a que las pequeñas partículas del sistema están asociadas con los flóculos; en el caso de las suspensiones defloculadas por el contrario, el sobrenadante es turbio por un periodo considerablemente largo de tiempo.

El hecho de que en los sistemas defloculados, las partículas más pequeñas enturbien la parte superior del mismo, está de acuerdo con la ley de Stokes en la que se establece que las partículas más grandes sedimentan más rápidamente que las pequeñas. Con base en lo anterior se puede decir que las características del sobrenadante durante el estado inicial de la sedimentación, es un buen indicador de las condiciones de floculación o defloculación del sistema.<sup>19</sup>

### 3.2.5.3 Parámetros de Sedimentación

Para determinar la sedimentación de una suspensión se usan dos parámetros que son: el volumen de sedimentación y el grado de floculación. El volumen de sedimentación ( $F$ ) está definido como la razón del volumen final a un tiempo dado ( $V_f$ ) entre el volumen inicial ( $V_o$ ), su expresión matemática es:

$$F = V_f / V_o \quad (F < 1)$$

El parámetro más usado en la determinación de la sedimentación es el grado de floculación- $\beta$ . Si consideramos una suspensión que está completamente defloculada (usada como punto de comparación), el último volumen de sedimentación será relativamente pequeño, representando este volumen como  $V_{\infty}$  y  $V_o$  como el volumen inicial, el volumen de sedimentación de la suspensión defloculada ( $F_{\infty}$ ) se define, como:

$$F_{\infty} = V_{\infty} / V_o$$

así el grado de floculación ( $\beta$ ) está dado por:

$$\beta = F / F_{\infty} \text{ o } \beta = V_f / V_{\infty}$$

### 3.2.5.4 Tamaño de Partícula y Viscosidad

El tamaño de partícula de la fase interna y la viscosidad del medio son de los parámetros de mayor importancia en el desarrollo de una suspensión, ya que la variación de éstos proporciona una herramienta muy útil a la hora de tratar de alcanzar el propósito que se busca al desarrollar una suspensión, que es prevenir la sedimentación o disminuir al máximo la velocidad con la que las partículas sedimentan. Existe una expresión matemática que relaciona la viscosidad y el diámetro de las partículas con la velocidad de sedimentación, y se conoce como la ley de Stokes, que se expresa como:

$$V = [d^2 (\rho_1 - \rho_2)g] / 18\eta$$

V= velocidad de sedimentación (cm/seg).

d= diámetro de la partícula (cm).

$\rho_1$ =densidad de la partícula (g/mL).

$\rho_2$ =densidad del medio de dispersión (g/mL).

g= aceleración de la gravedad (980.7 cm seg<sup>-2</sup>).

$\eta$ = viscosidad

En esta ecuación se puede observar que el cuadrado del diámetro es directamente proporcional a la velocidad de sedimentación lo que significa, que las partículas pequeñas sedimentan más lentamente que las partículas grandes. En la práctica; sin embargo, la reducción del tamaño de partícula resulta ser un paso limitante debido al tiempo y a los costos del equipo involucrado.

Es importante resaltar que la ecuación es válida para suspensiones diluidas (menor a 2g/100 mL), partículas esféricas (con una dispersión homogénea) y además que no presente interacciones moleculares. Es evidente que con las limitaciones antes mencionadas la ley de Stokes no proporciona datos precisos, aunque en la mayoría de los casos, es de gran ayuda para entender las técnicas usadas para desarrollar una suspensión. Otro límite para esta ley se presenta si el tamaño del fármaco es menor a 3  $\mu\text{m}$  y su densidad no difiere en más de un 20 % de la del vehículo, ya que estas partículas presentan movimientos Browniano y

frecuentemente producen agregados y posteriormente "cake" con lo cual la resuspendibilidad resulta prácticamente imposible.

Para los sistemas en los que el tamaño de partícula es uniforme y la forma puede variar, la ecuación de Stokes se escribe de la siguiente manera:

$$v' = v\varepsilon^n$$

En donde  $v'$  representa la velocidad de sedimentación corregida;  $v$  la velocidad según la ec. de Stokes;  $\varepsilon$  la fracción inicial de la suspensión mezclada uniformemente (0-1) y  $n$  es la medida de las interacciones del sistema y es propia para cada sistema.

La ley de Stokes también establece que al aumentar la viscosidad del medio de dispersión habrá una disminución de la velocidad de sedimentación, sin embargo, hay que tener en cuenta que suspensiones demasiado viscosas son difíciles de administrar y que un alto grado de viscosidad no garantizará que no se dé la formación de "cake".<sup>15,16,18,19,25</sup>

**OBJETIVOS:**

Con este trabajo se busca:

- Sintetizar de 150 a 250 g del fasciolicida alfa (5-Cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol).
- Desarrollar una forma farmacéutica estable del fasciolicida alfa, que permita su fácil dosificación para el ganado.
- Asentar los Procedimientos Normalizados de Operación (PNO's) para la preparación de dicha forma farmacéutica.
- Extraer el principio activo de la forma farmacéutica, y desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), capaz de cuantificarlo.

## 5 DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1 Síntesis

#### 5.1.1 Instrumentación

Los puntos de fusión (Pf) se determinaron en un aparato Büchi® modelo B-540 y no están corregidos.

Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer® de transformadas de Fourier modelo FT-IR-1600 en pastilla de bromuro de potasio; las señales se reportaron en  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón ( $\text{RMN } ^1\text{H}$ ) se determinaron en un espectrómetro VARIAN® modelo Unity Inova de 300 MHz, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna; deuterocloroformo ( $\text{CDCl}_3$ ) y/o dimetilsulfóxido (DMSO) como disolventes y agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) para el intercambio de hidrógeno. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se dan en partes por millón (ppm), y se señalan los singuletes (s) y multipletes (m).

Los espectros de masas se determinaron en un espectrómetro de masas (EM) JEOLR® Modelo JMS-SX102A acoplado de un cromatógrafo de gases (CG) HP® 5890 Serie II, usando la técnica de impacto electrónico (IE). La simbología manejada es:  $m/z$  (masa/carga),  $M^+$  (ión molecular),  $M+1$  y  $M+2$  (picos isotópicos).

#### 5.1.2 Equipo

Para concentrar las soluciones se empleó un evaporador rotatorio marca Büchi® modelo R-114, con vacío generado por una bomba GAST® modelo Q523-V47-6582DX ajustada a 50mmHg y un condensador enfriado por un refrigerador VWR Scientific® modelo 1107.

Para efectuar las reacciones a temperatura constante se empleó una parrilla automática IKA® modelo IKAMAG® RET básica con sensor de temperatura modelo IKATRON® ETS-D4fuzzy.



### 5.1.3 Cromatografía

El seguimiento del progreso de las reacciones se realizó por cromatografía de capa fina (ccf). Para ello se emplearon placas de vidrio recubiertas con gel de Sílice 60 F-254 de la casa Merck®. Los compuestos orgánicos se visualizaron con luz UV y por exposición a vapores de yodo.

### 5.1.4 Sistemas de Elución

En la cámara de elución se usaron 10 mL del Sistema en cuestión. La composición y proporciones de los Sistemas utilizados fueron las siguientes:

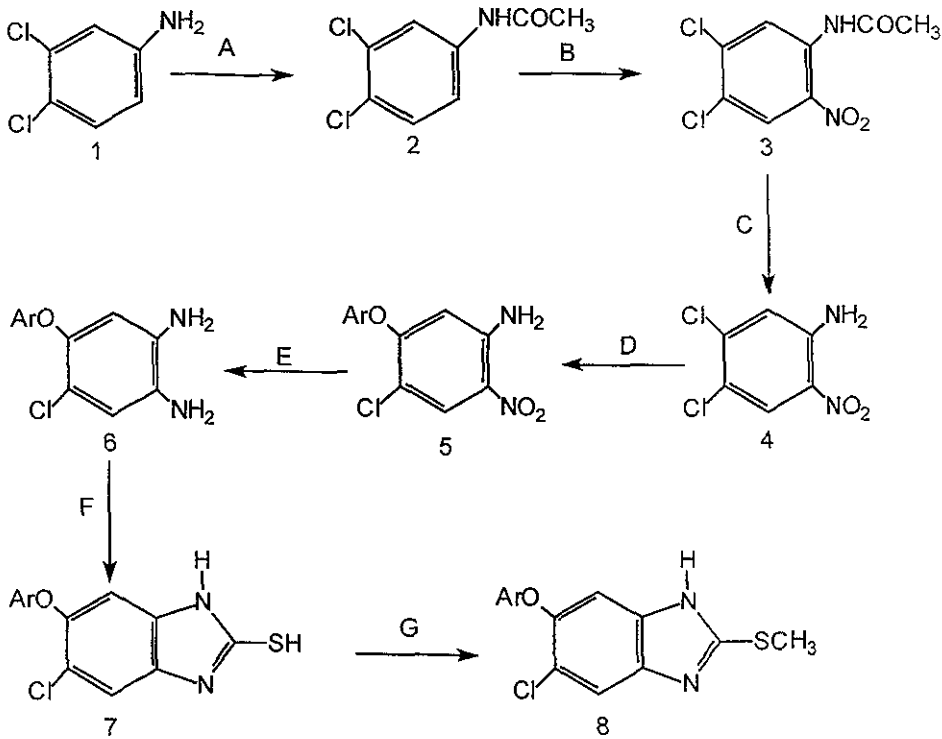
SISTEMA	COMPOSICIÓN	PROPORCIÓN
I	Hexano-Cloroformo-Acetato de Etilo.	50:35:15
II	Cloroformo-Metanol.	90:10
III*	Cloroformo-Metanol.	98:2
IV	Cloroformo-Metanol.	99:1

\*Más dos gotas de hidróxido de amonio concentrado.

## 5.1.5 Ruta de Síntesis

Para la síntesis del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (fasciolida alfa) se partió de materias primas sencillas y de fácil adquisición como la 3,4-dicloroanilina y se siguió la secuencia que se muestra en el Esquema 1.

Esquema 1: Secuencia de síntesis para la obtención del compuesto Alfa (a).

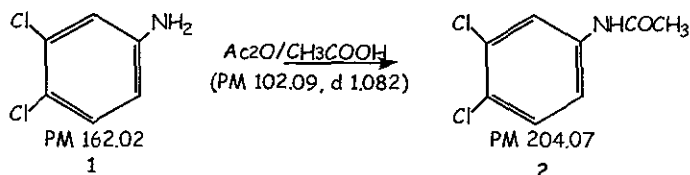


A)  $\text{Ac}_2\text{O}/\text{AcOH}$     B)  $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$     C)  $\text{KOH}, \text{EtOH}$     D)  $\alpha$ -naftol,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF

E)  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}, \text{EtOH}$ ;    F)  $\text{CS}_2, \text{KOH}, \text{EtOH}, 60-70^\circ\text{C}$     G)  $\text{CH}_3\text{I}, \text{KOH}, \text{EtOH}, 5-10^\circ\text{C}$

## 5.1.6 Descripción de las Reacciones

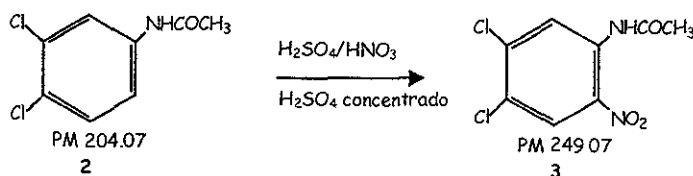
## 5.1.6.1 3,4-Dicloroacetanilida (2)



En un vaso de precipitados de 2 L, acondicionado con termómetro y varilla de agitación, se colocaron 500g (3.086 mol) de 3,4-dicloroanilina (1) y 130 mL de ácido acético. Esta mezcla se enfrió con baño de hielo/agua y se agitó vigorosamente mientras se añadieron 364 mL (3.8579 mol; 393.85g, 1.25Eq) de anhídrido acético ( $\text{Ac}_2\text{O}$ ). La adición del  $\text{Ac}_2\text{O}$  se hizo de tal forma que la temperatura de la reacción no excediera los  $70^\circ\text{C}$ . El término de la reacción se detectó por ccf (Sistema I), y fue después de 15 minutos. A la mezcla semisólida formada se le adicionó 1 L de agua fría, se agitó y el precipitado blanco se separó por filtración al vacío, lavándose repetidas veces con agua hasta pH neutro y luego se secó en la estufa a  $85^\circ\text{C}$  durante 24 h. Se obtuvieron 620.87g (98.6%) de un polvo blanco, con una sola mancha por ccf ( $R_f$  0.31, Sistema I). De una muestra recristalizada de  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{H}_2\text{O}$  se lograron cristales blancos con Pf  $121\text{-}122^\circ\text{C}$  [Lit.  $120.5^\circ\text{C}$ ].<sup>22</sup>

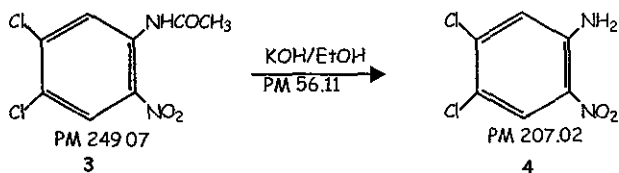
Para todas las reacciones los pesos moleculares (PM) están dados en g/mol y las densidades (d) en  $\text{g}/\text{cm}^3$

## 5.1.6.2 4,5-Dicloro-2-nitroacetanilida (3)



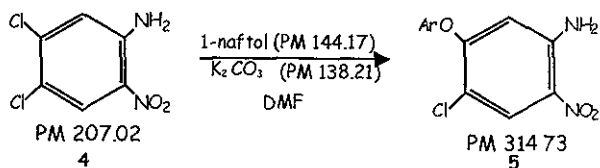
En un vaso de precipitados de 4 L, acondicionado con termómetro, agitación mecánica, embudo de adición y baño de hielo-sal granular, se disolvieron 615.4g (3.0156 mol) de 3,4-dicloroacetanilida (2) pulverizada, en 1300 mL de  $H_2SO_4$  concentrado, a una temperatura de  $10^{\circ}C$ . A la solución ámbar-oscuro formada se le gotearon 500 mL de mezcla sulfonítrica ( $H_2SO_4-HNO_3$ , 1:1), previamente enfriada a  $-5^{\circ}C$  con hielo seco/acetona. La adición se hizo de tal forma que la reacción se mantuviera entre  $17$  y  $20^{\circ}C$ . Terminada la adición se retiró el baño de hielo y se mantuvo la agitación por 30 minutos más. Después de comprobarse por ccf el consumo total de la materia prima, la mezcla de reacción se vertió sobre 15 Kg de hielo. Esta mezcla se agitó y filtró, el residuo amarillo se lavó repetidas veces con agua hasta pH neutro. Se reunieron los filtrados y fueron neutralizados con sosa industrial para ser desechados. El producto crudo de la reacción mostró dos manchas por ccf (Sistema I). La purificación se logró por maceración y agitación del crudo de la reacción en metanol (MeOH) helado y filtración. Esta operación se realizó dos veces. El sólido amarillo claro obtenido (638.49g, 85%) mostró una mancha principal por ccf y una pequeña impureza de mayor polaridad. Una muestra se recrystalizó de MeOH/ $H_2O$  y se obtuvieron cristales amarillo-claro con Rf 0.65 (Sistema I) y Pf  $121-123^{\circ}C$  [Lit. 123-124]<sup>22</sup>.

## 5.1.6.3 4,5-Dicloro-2-nitroanilina (4)



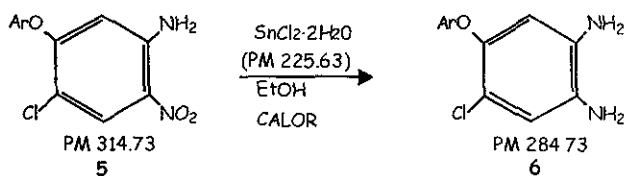
En un matraz de 5 L con tres bocas esmeriladas 24/40, acondicionado con agitación mecánica, condensador en posición de reflujo, embudo de adición y canasta de calentamiento, se disolvieron 400 g (1.606 mol) de 4,5-dicloro-2-nitroacetanilida (3) en 2 L de etanol (EtOH) en caliente. Después, se retiró la fuente de calor y se dejó enfriar a 60°C. Entonces se agregó por goteo una solución de 114 g (2.0317 mol; 1,265 Eq) de KOH en 200 mL de H<sub>2</sub>O; después, se reanudó el calentamiento a reflujo por espacio de 25 minutos. Comprobada la finalización de la reacción por ccf (Sistema I), la mezcla de reacción se vertió sobre un vaso de precipitados y se dejó en reposo hasta el día siguiente. Luego se filtró y el precipitado amarillo-naranja se suspendió en CH<sub>3</sub>COOH:H<sub>2</sub>O y se agitó en frío por una hora. Se filtró y se lavó repetidas veces con H<sub>2</sub>O hasta lograr un pH neutro. Se obtuvieron 236.06 g (71%) de cristales amarillo claro con Rf 0.63 (Sistema IV) y Pf de 177-178°C [Lit. 177-179].<sup>22,23</sup>

## 5.1.6.4 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (5)



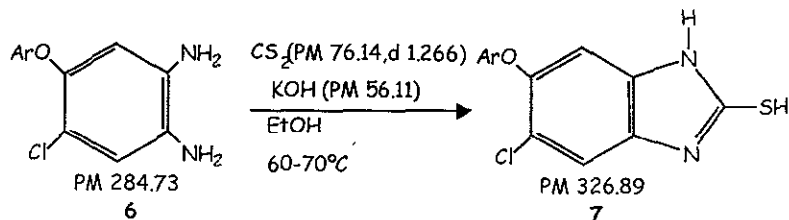
En un matraz de bola de 3L acondicionado con agitación mecánica, termómetro y baño de aceite, se colocaron 250g (1.207 mol) de 4,5-dicloro-2-nitroanilina (4), 250g (1.809 mol; 1.5 Eq) de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 175 g (1.2138 mol; 1.0052 Eq) de α-naftol. Luego, se añadieron 905 mL de dimetilformamida (DMF) y se inició el calentamiento cuidando que la temperatura no sobrepasara los 117°C ni bajara de 115°C. Se apagó la parrilla después de tres y media horas de reacción y se dejó enfriar hasta el día siguiente. Se filtró con succión y el filtrado se concentró a presión reducida en un rotaevaporador. Se obtuvo un líquido viscoso de color café oscuro muy intenso. Para llevar a cabo la purificación de la mezcla de reacción se agregó MeOH helado y agitó mecánicamente, con lo que se formó precipitado naranja oscuro, al que se le repitió el lavado con MeOH frío. De esta manera se obtuvieron 269.71g (71%) de un polvo naranja oscuro. Una pequeña muestra de este sólido se recrystalizó de tolueno con carbón activado. Los cristales formados presentaron un Pf de 145-146°C y un Rf de 0.56 (Sistema IV).

## 5.1.6.5 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (6)



En un matraz de bola de 5 L, acondicionado con baño de aceite, termómetro, condensador en posición de reflujo, agitación magnética y atmósfera de nitrógeno, se añadieron 250 g (0.794mol) de 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (5), 1075 g (4.76 mol; 6 Eq) de cloruro estanoico dihidratado (SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) pulverizado como agente reductor y 1.6 L de EtOH absoluto. La mezcla anterior se calentó hasta alcanzar el reflujo, el cual se mantuvo durante dos horas. Se dejó enfriar a 60°C, se puso en un vaso de precipitados de 4 L. Se enfrió con baño de hielo y llevó a un pH de 8 con una solución de NaOH concentrada. Con el ajuste del pH, la solución que era de color café oscuro se torna rosa claro y se hizo tan viscosa, que fue necesaria la agitación manual. Este producto de color rosado se llevó a sequedad en el rotaevaporador y se obtuvo un sólido arenoso al que se le extrajo con acetato de etilo (4 x 1200 mL) y agitación mecánica el producto formado. El acetato de etilo se lavó dos veces (400mL) con Brine (solución saturada de NaCl) y una vez con agua (400 mL), después se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y luego se filtró. Se concentró a sequedad en el rotaevaporador y se obtuvieron 224 g (99.08%) de un líquido viscoso color café: que en ccf presentó una mancha principal con un R<sub>f</sub> de 0.30 (Sistema III). Este producto sin posterior purificación se sometió a la siguiente reacción. Para obtener sus espectros se formó el diclorhidrato correspondiente mediante el burbujeo de un exceso HCl (gas) a una solución en éter del compuesto 6.

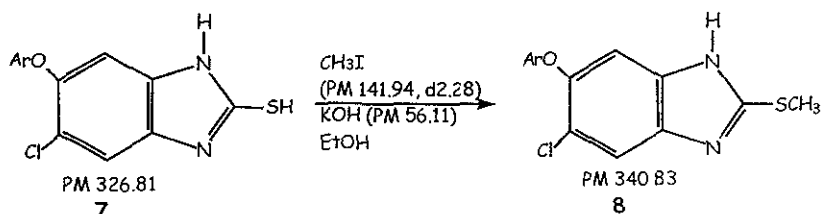
## 5.1.6.6 5-Cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (7)



En un matraz de bola de 2 L con tres bocas, acondicionado con agitación magnética, baño de aceite, condensador de doble pared en posición de reflujo, tapón de hule en una boca y atmósfera de nitrógeno, se mezclaron 180 g (0.632 mol) del producto crudo de reducción anterior (6), 825 mL de EtOH, una solución de 53.72 g (0.957 mol; 1.51 eq) de KOH en 70 mL de H<sub>2</sub>O y 57.4 mL (72.67 g, 0.954 mol; 1.5 eq) de CS<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se calentó y se mantuvo a reflujo por espacio de una hora. Después de verificarse la desaparición de la materia prima (6) por ccf, la mezcla de reacción se retiró del baño de aceite para dejarse enfriar hasta el día siguiente. Se formó un precipitado de color amarillo, el cual se separó por filtración y resuspendió en agua para ajustar el pH a 6 con una solución de AcOH al 20% (a las aguas madres se les trató de igual manera). A continuación se lavó con EtOH:H<sub>2</sub>O y se dejó secar durante dos días en la estufa, obteniéndose 160 g (77.4 %) de un sólido de color café pálido. 3.5 g del producto crudo se trataron con carbón activado en isopropanol; el sólido obtenido presentó una mancha principal en ccf con un R<sub>f</sub> 0.40 (Sistema II) y un P<sub>f</sub> 273-275 °C.



## 5.1.6.7 5-Cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (8)



En un matraz de 2 L con tres bocas esmeriladas 24/40, adaptado con agitación magnética, termómetro, embudo de adición y baño de hielo-agua-sal, se suspendieron 160 g (0.4896 mol) del compuesto 7 en 500 mL de EtOH; luego, se añadió una solución de 33 g (0.5881 mol; 1.2 eq) de KOH en 200 mL de EtOH, bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. La solución resultante, de color café oscuro se agitó por 30 minutos y cuando llegó a 0°C se gotearon 30.48 mL (69.49 g, 1 eq) de CH<sub>3</sub>I. La adición se hizo de tal forma que la temperatura no fuera mayor de 10°C. Después de haber agregado 27.43 mL (0.9 eq) de CH<sub>3</sub>I se analizó una muestra por ccf (sistema III) y se comprobó la desaparición del compuesto 7. Se procedió entonces a neutralizar la mezcla en frío, con una solución de HCl al 20%. La solución se concentró rotaevaporador y el sólido obtenido se suspendió en agua, se agitó y se separó por filtración. Se formó un sólido de color crema, el cual se disolvió en exceso de acetato de etilo:acetona (70:30) y se trató con carbón activado. Después de agitar durante 30 minutos a reflujo, se filtró y la solución de color amarillo paja resultante se concentró a la tercera parte de su volumen, luego se agregó un volumen igual de MeOH y se enfrió en baño de hielo con agitación. Se formó un sólido que se separó por filtración, después se lavó con MeOH helado. Se obtuvieron 150 g (89.9%) de un sólido blanco, con una sola mancha en ccf (Rf 0.39, sistema III) y Pf 181-182°C.

## 5.2 Desarrollo de una Forma Farmacéutica

### 5.2.1 Elección de la Forma Farmacéutica a Desarrollar

Una vez concluida la primera parte del proyecto, la síntesis del principio activo se procedió al desarrollo de una forma farmacéutica (f.f.) adecuada para la administración de éste al ganado. La primera pregunta que surgió al empezar este segundo periodo experimental fue ¿Qué forma farmacéutica es la más conveniente para la dosificación del fasciolicida alfa? Para poder elegir entre las distintas posibilidades y tomar una decisión acertada, se tomaron en cuenta algunas características con las que tenía que contar la f.f. a desarrollar y así optar por la mejor. Entre las características que se buscaron destacan: la flexibilidad en la dosificación, la estabilidad (física y química), de fabricación sencilla, rápida y de bajo costo.

Como ya se ha mencionado, el fasciolicida alfa se obtuvo como un polvo insoluble en agua. Su alta insolubilidad en agua impidió el uso de una f.f. en la que el fasciolicida alfa estuviera disuelto en agua, como jarabes, una solución oral o inyectable, o bien polvos para reconstituir. Las cápsulas de gelatina dura, tabletas y suspensiones son f.f.'s que permiten la administración de este tipo de compuestos insolubles en agua; sin embargo, las dos primeras presentan la característica de la dosificación única que para el caso del compuesto Alfa resulta ser una desventaja, pues para su administración se debe ajustar la dosis al peso del animal. Además la fabricación de una suspensión es sencilla, rápida y no requiere de equipo muy costoso, sumado a esto las suspensiones favorecen la estabilidad química del fármaco, por no tener al mismo en solución. Con base en lo planteado anteriormente, se tomó la decisión de que fuera una suspensión, y no una forma farmacéutica sólida.

Con relación a la formulación de la suspensión por desarrollar se contaba con dos antecedentes. En el primero, se probaron cuatro distintas formulaciones y con base en la eficiencia mostrada (porcentaje de desaparición de las fasciolas en animales), se llegó a la conclusión de que la llamada formulación 1 (pág. 43) fue la que presentó mejores resultados. El otro antecedente para el uso de suspensiones fueron las pruebas farmacocinéticas de dos

---

distintas formulaciones que fueron usadas: una en bovinos (formulación 2) y otra en ovinos (formulación 3) -pág. 44-. Sin embargo, no existe evidencia documental de todo el proceso de su manufactura ni de las características que presentaron ninguna de las tres formulaciones citadas. Además, estas suspensiones fueron administradas al poco tiempo de su fabricación por lo que no se tiene registro de la estabilidad física de dichas suspensiones.<sup>5,8,20</sup>

A continuación se describe el desarrollo de una forma farmacéutica fabricada acorde a las Buenas Prácticas de Fabricación; ya que es indispensable asegurar que la forma farmacéutica no sea una variable en las pruebas *in vivo* y los resultados que aporten éstas sean significativos, confiables, representativos y objetivos.

### 5.2.2 Desarrollo de un PNO para las Formulaciones 1, 2 y 3

Esta fase tuvo como meta desarrollar un PNO para la fabricación de las formulaciones preliminares (1, 2 y 3), y poder determinar sus propiedades (pH, viscosidad, densidad y apariencia), así como realizar la observación de su comportamiento a corto plazo.

#### 5.2.2.1 Búsqueda de un Substituto para el Fasciolicida Alfa

La cantidad de principio activo con la que se contó (150g), no era suficiente para probar estas tres formulaciones preliminares y finalmente proveer a las instancias correspondientes\* con suficiente cantidad de fasciolicida alfa formulado, para iniciar las pruebas de toxicidad. Tomando como base lo anterior, se realizaron algunas pruebas inicialmente con otros principios activos para poder usar un sustituto que proporcionara información acerca del comportamiento que podíamos esperar del fasciolicida alfa. Para encontrar dicho sustituto fueron probados el mebendazol (en dos diferentes presentaciones denominadas A y B) y metronidazol, a los cuales se les determinaron los

---

\* Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

parámetros reológicos básicos para su caracterización. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Tabla 7. Reología de los posibles sustitutos del fasciolícida alfa.

<i>Fármaco</i>	<i>Densidad Aparente</i> [g/mL]	<i>Densidad Compactada</i> [g/mL]	<i>% de Compresibilidad</i> (Indice de Carr)
Mebendazol "A"	0.32	0.54	40.7
Mebendazol "B"	1.02	1.33	23.3
Metronidazol	0.71	0.83	14.4
Fasciolícida alfa	0.41	0.54	24.1

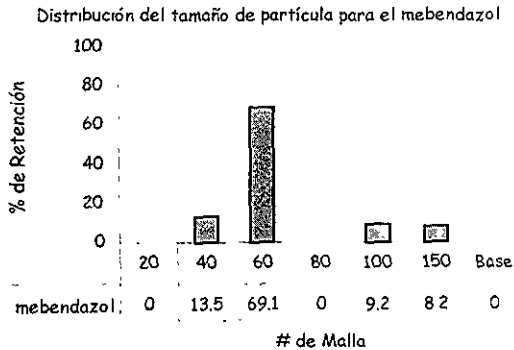
Mebendazol "A": Polvo amarillo muy fino.

Mebendazol "B": Polvo café de consistencia granular.

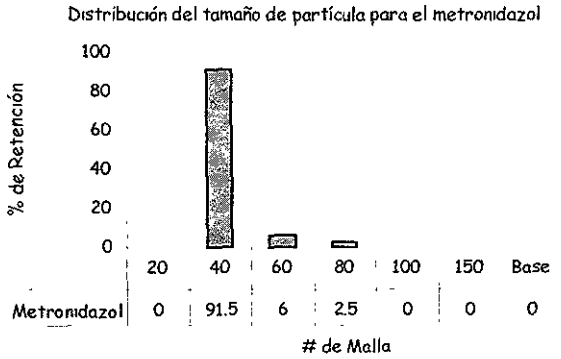
Metronidazol: Cristales color amarillo muy tenue.

Fasciolícida alfa. Polvo blanco fino, con algunos grumos.

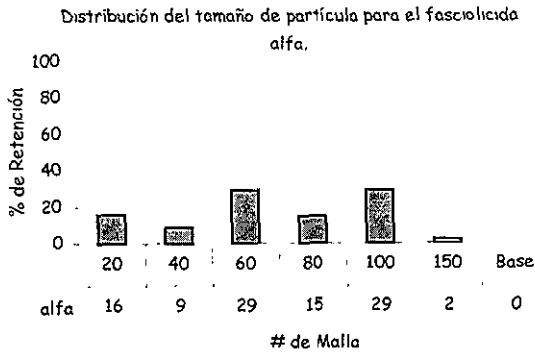
Gráfica 2: Distribución del tamaño de partícula para el mebendazol "A".



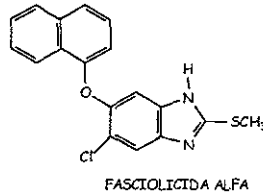
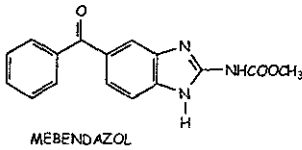
Gráfica 3: Distribución del tamaño de partícula para el metronidazol.



Gráfica 4: Distribución del tamaño de partícula para el fasciolicida alfa.



De las determinaciones reológicas se tiene que el mebendazol "A" fue el de mayor similitud en lo que a la densidad aparente se refiere, con 0.32 g/mL comparada con los 0.41 g/mL del fasciolicida alfa (tabla 7); en cuanto a la distribución del tamaño de partícula el mebendazol "A" (gráfica 2) concentró el 78% entre la malla 60 y 100, siendo para el fasciolicida alfa el 73% en el mismo intervalo de mallas. Las estructuras del mebendazol y el fasciolicida alfa se presentan a continuación:



Analizados los resultados obtenidos, así como el comportamiento de los fármacos durante las determinaciones reológicas y la similitud de sus estructuras químicas, se seleccionó el mebendazol "A" como principio activo para realizar las suspensiones preliminares.

Una vez que se decidió usar el mebendazol "A", se propuso el proceso de fabricación de las suspensiones con las formulaciones 1, 2 y 3 llamado: PNO TF-A-001 (ver anexo-PNO's).

#### Formulación 1.<sup>20</sup>

Componente	Cantidad	Función
Fasciolicida alfa	10 g	Principio activo
Pectina	1.5g	Agente suspensor
CMC *(baja viscosidad)	0.5 g	Agente suspensor
CMC (media viscosidad)	0.5 g	Agente suspensor
Sacarina sódica USP	0.2 g	Edulcorante artificial
Metilparabeno	0.5 g	Conservador
Propilparabeno	0.03 g	Conservador
Agua purificada c.b.p.	100 mL	Medio de dispersión

Después de 24 h de fabricada la suspensión anterior se encontró un precipitado cristalino, el cual se separó por filtración al vacío y lavó con H<sub>2</sub>O fría. Al analizar los componentes de la formulación y sus proporciones se encontró que los parabenos (principalmente el metilparabeno) estaban por encima de las concentraciones recomendadas. Fue realizada una ccf comparativa para confirmar esta sospecha y se encontró que el metilparabeno era el responsable de la formación del precipitado. Por lo tanto se redujo la cantidad de los conservadores a las recomendadas: 0.18g/100mL y 0.02g/100mL de metilparabeno y propilparabeno respectivamente.<sup>16</sup>

\*CMC = Carboximetilcelulosa

Formulación 1'(modificada). Según PNO TF-A-001.

Componente	Cantidad
Mebendazol	10 g
Pectina	1.5g
CMC ( <i>baja</i> viscosidad)	0.5 g
CMC ( <i>media</i> viscosidad)	0.5 g
Sacarina sódica USP	0.2 g
Metilparabeno	0.18 g
Propilparabeno	0.02 g
Agua purificada c.b.p.	100 mL

Formulación 2. Según PNO TF-A-001.<sup>5</sup>

Componente	Cantidad
Mebendazol	7 g
Pectina USP	0.5 g
CMC ( <i>media</i> viscosidad)	2.5 g
CMC ( <i>alta</i> viscosidad)	0.85 g
Sacarina sódica USP	0.2 g
Agua purificada c.b.p.	100 mL

Formulación 3. Según PNO TF-A-001.<sup>8</sup>

Componente	Cantidad
Mebendazol	5 g
Pectina USP	0.5 g
CMC ( <i>media</i> viscosidad)	2.5 g
CMC ( <i>alta</i> viscosidad)	0.85 g
Sacarina sódica USP	0.2 g
Agua purificada c.b.p.	100 mL

Después de una semana de haber sido preparadas las suspensiones anteriores se observó que la formulación 1 presentó un sedimento difícil de resuspender (cake), y las formulaciones 2 y 3 eran demasiado viscosas, dificultándose con ello su manejo. Por lo anterior, se decidió usar otros excipientes con el fin de encontrar una suspensión que no presentara cake y con una viscosidad tal que facilitara su manejo y por consiguiente su administración.

### 5.2.3 Pruebas con Diferentes Excipientes

Como se mencionó, el fasciolicida alfa presenta una similitud extraordinaria con el triclabendazol -Fasinex®, por lo que se trabajó con los excipientes que reportan Boray y cols.<sup>21</sup> para esta suspensión. Obviamente las proporciones de los componentes no están bien definidas así que se realizaron algunas pruebas, para las que se continuó usando el sustituto antes mencionado y según los lineamientos del PNO TF-A-002 (ver anexo-PNO's) propuesto.

#### Formulación 4. Según PNO TF-A-002.

Componente	Cantidad	Función
Mebendazol	10 g	Principio activo
Aerosil 200	1 g	Agente suspensor
Caolín coloidal	5 g	Agente suspensor
Sacarina sódica USP	0.2 g	Edulcorante artificial
Metilparabeno	0.18 g	Conservador
Propilparabeno	0.02 g	Conservador
Agua purificada c.b.p.	100 mL	Medio de dispersión

#### Formulación 5. Según PNO TF-A-002.

Componente	Cantidad	Función
Mebendazol	10 g	Principio activo
CMC ( <i>baja</i> viscosidad)	0.5 g	Agente suspensor
CMC ( <i>media</i> viscosidad)	0.5 g	Agente suspensor
Aerosil 200	1 g	Agente suspensor
Caolín coloidal	5 g	Agente suspensor
Sacarina sódica USP	0.2 g	Edulcorante artificial
Metilparabeno	0.18 g	Conservador
Propilparabeno	0.02 g	Conservador
Agua purificada c.b.p.	100 mL	Medio de dispersión



## Formulación 6. Según PNO TF-A-002.

Componente	Cantidad
Mebendazol	10 g
CMC ( <i>baja</i> viscosidad)	0.5 g
CMC ( <i>media</i> viscosidad)	0.5 g
Aerosil 200	1.5 g
Caolín coloidal	7.5 g
Sacarina sódica USP	0.2 g
Metilparabeno	0.18 g
Propilparabeno	0.02 g
Agua purificada c.b.p.	100 mL

Por último se realizaron algunas pruebas usando un cosolvente (propilenglicol) y como agentes suspensores se utilizaron dos distintos tipos de carbopol (971P y 974P). Estas últimas suspensiones se prepararon de acuerdo a lo descrito por el PNO TF-A-003 (ver anexo-PNO's).

## Formulación 7. Según PNO TF-A-003.

Componente	Cantidad	Función
Mebendazol	10 g	Principio activo
Propilenglicol	2 mL	Cosolvente
Carbopol 974 P	0.5 g	Agente suspensor
Metilparabeno	0.18 g	Conservador
Propilparabeno	0.02 g	Conservador
Agua purificada c.b.p.	100 mL	Medio de dispersión

## Formulación 8. Según PNO TF-A-003.

Componente	Cantidad
Mebendazol	10 g
Propilenglicol	10 mL
Carbopol 974 P	0.5 g
Metilparabeno	0.18 g
Propilparabeno	0.02 g
Agua purificada c.b.p.	100 mL

## Formulación 9. Según PNO TF-A-003.

Componente	Cantidad
Mebendazol	10 g
Propilenglicol	10 mL
Carbopol 974 P	0.2 g
Metilparabeno	0.18 g
Propilparabeno	0.02 g
Agua purificada c.b.p.	100 mL

## Formulación 10. Según PNO TF-A-003.

Componente	Cantidad
Mebendazol	10 g
Propilenglicol	5 mL
Carbopol 974 P	0.2 g
Metilparabeno	0.18 g
Propilparabeno	0.02 g
Agua purificada c.b.p.	100 mL

## Formulación 11. Según PNO TF-A-003.

Componente	Cantidad
Mebendazol	10 g
Propilenglicol	15 mL
Carbopol 971 P	0.2 g
Metilparabeno	0.18 g
Propilparabeno	0.02 g
Agua purificada c.b.p.	100 mL

## Formulación 12. Según PNO TF-A-003.

Componente	Cantidad
Mebendazol	10 g
Propilenglicol	10 mL
Carbopol 974 P	0.2 g
Metilparabeno	0.18 g
Propilparabeno	0.02 g
Agua purificada c.b.p.	100 mL

## Formulación 13. Según PNO TF-A-003.

Componente	Cantidad
Mebendazol	10 g
Propilenglicol	10 mL
Carbopol 974 P	0.1 g
Metilparabeno	0.18 g
Propilparabeno	0.02 g
Agua purificada c.b.p.	100 mL

## Formulación 14. Según PNO TF-A-003.

Componente	Cantidad
Mebendazol	10 g
Propilenglicol	10 mL
Carbopol 974 P	0.15 g
Metilparabeno	0.18 g
Propilparabeno	0.02 g
Agua purificada c.b.p.	100 mL

De todas las formulaciones probadas con el mebendazol, las que presentaron las mejores características de apariencia, manejo y estabilidad física fueron las formulaciones 6 y 13. Así, estas dos formulaciones fueron las que se probaron con el fasciolicida Alfa en una escala de 10 g. A su vez, los mejores resultados los mostró la formulación 6 -llamada formulación 6( $\alpha$ )-, ya que el compuesto Alfa no pudo ser incorporado en la formulación 13.

### 5.3 Valoración del fasciolicida alfa en la suspensión

Con la finalidad de comprobar la cantidad de principio activo en la suspensión del fasciolicida Alfa (formulada bajo el PNO TF-A-002, ver apéndice-PNO's), se desarrolló un método de extracción y se ajustó la metodología propuesta previamente para la cuantificación del compuesto Alfa por HPLC.<sup>5,8</sup> Así, podríamos tener la certeza de que siguiendo lo descrito en el procedimiento de manufactura, se puede obtener una suspensión con características adecuadas para la administración del principio activo.

#### 5.3.1 Reactivos

- Fasciolicida alfa
- Metanol grado analítico -R.A.- (Baker)
- Acetato de etilo grado analítico -R.A.- (Baker)
- Metanol grado cromatográfico (Mallinckrodt)
- Acetonitrilo grado cromatográfico (Mallinckrodt)
- Agua bidestilada y desionizada
- Brine (solución acuosa saturada de NaCl) ajustado con  $\text{NaHCO}_3$  a pH 8.

#### 5.3.2 Instrumentación

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) Shimadzu equipado con bomba LC-10AT, automuestreador SIL-10A, detector SPD-10AV, controlador del sistema SCL-10<sup>a</sup>, con software acoplado en la integración.
- Balanza analítica Sartorius

#### 5.3.3 Equipo

- Baño de ultrasonido modelo MF, Mettler Electronics
- Propipetas automáticas de 3000, 1000 y 500  $\mu\text{L}$

### 5.3.4 Condiciones cromatográficas

- Fase móvil: Metanol:Acetonitrilo:Agua en una proporción de 40:30:30 respectivamente. Los volúmenes fueron medidos con una probeta de 1 L y la mezcla se colocó durante 30 min en el ultrasonido.
- Columna: Water spherisorb® S5 ODS5; 4.6 x 250 mm Analytical column.
- Velocidad de flujo: 1.5 mL/min.
- Volumen de inyección: 50  $\mu$ L
- Temperatura: Ambiente
- Presión máxima alcanzada: 198-200 Kg/cm<sup>2</sup>
- Longitud de onda: 304 nm.
- Tiempo de corrimiento: 8.4 min.

### 5.3.5 Curva de calibración

Se pesaron lo más cercano posible a 0.0500 g del fasciolida alfa y se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50 mL. Luego se disolvió completamente con MeOH (R.A.) por medio de agitación y se llevó al aforo. Para formar la solución "stock" se tomaron 5 mL de la solución anterior y se aforó a 10 mL con fase móvil para tener al final una concentración de 500  $\mu$ g/mL. Para obtener la curva de calibración, las soluciones se prepararon a las siguientes concentraciones:

Alícuota (mL)	Aforo (mL)*	Conc. final ( $\mu$ g/mL)
1.0	5	100
0.5	5	50
0.5	10	25
0.3	10	15
0.2	10	10

\*El aforo se realizó con fase móvil.

El procedimiento se repitió tres veces para la construcción de tres curvas de calibración independientes entre sí (pesadas independientes).

### 5.3.6 Extracción del fasciolicida alfa de la suspensión

Después de agitar vigorosamente la suspensión durante un minuto, se transfirió una alícuota (3 mL), equivalente a 300 mg de fasciolicida alfa a un embudo de separación de 80 mL. Se agregaron 17 mL de fase acuosa (Brine pH = 8) y se realizaron tres extracciones con 30 mL acetato de etilo (R.A), agitando tres minutos en cada ocasión. Las fracciones de la fase orgánica se colectaron en un matraz volumétrico de 100 mL, aforando con el mismo disolvente utilizado en las extracciones.

De la solución anterior se tomó un mL, se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL y se evaporó el disolvente por medio de vacío. El sólido formado se disolvió y aforó a 10 mL con fase móvil. Luego se realizó una dilución 1:10 de esta última solución para llegar a la concentración adecuada de inyección (30 µg/mL).

## 6 RESULTADOS

## 6.1 Síntesis

Las constantes físicas de los compuestos sintetizados, rendimientos de las diferentes reacciones y disolventes de recristalización se muestran en la tabla 8. De los compuestos 2, 3 y 4 sólo se calcularon sus constantes físicas (Pf y Rf), debido a que son compuestos ya reportados.

Tabla 8. Constantes físicas y rendimientos.

COMPUESTO	Rf	Pf (°C)		% Rend.	Disolvente(s) de cristalización	Ref.
		Encontrado	Reportado			
1	0.12 <sup>I</sup>	---	---	---	---	---
2	0.31 <sup>I</sup>	121-122	120.5	98.6	EtOH	22
3	0.65 <sup>I</sup>	121-123	123-124	85.0	MeOH:H <sub>2</sub> O	22
4	0.63 <sup>I</sup>	177-178	177-179	71.0	CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O	22,23
5	0.56 <sup>IV</sup>	145-146	136-138	70.9	Tolueno	31
6*	0.30 <sup>III</sup>	---	---	99.1	---	31
7	0.40 <sup>II</sup>	273-275	273-275	77.4	Isopropanol:H <sub>2</sub> O	31
8	0.39 <sup>III</sup>	181-182	172-175	89.9	---	31

\*Se formó el diclorhidrato.

El rendimiento global de la síntesis del fasciolicida Alfa (8) a partir de la 4,5-dicloro-2-nitroanilina (4) fue de 48.9 %; la cual se preparó en tres etapas con un rendimiento global de 59.5%.

Para confirmar la obtención de los intermediarios 5, 6, 7 y 8 se realizó su caracterización por espectroscopia (IR, RMN) y espectrometría (EM). La interpretación de estos espectros se presenta a continuación:

➤ 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (5)

Su espectro de IR (No. 1) presentó dos bandas agudas correspondientes a la amina aromática (Ar-NH<sub>2</sub>) en 3347 y 3462 cm<sup>-1</sup>, las bandas del anillo aromático de 1990-1700 cm<sup>-1</sup> (Ar) y la banda del éter aromático (Ar-O-R) en 1225 cm<sup>-1</sup>. El espectro de RMN<sup>1</sup>H (No. 2) mostró señales en 5.9 (s, 1H, H en C<sub>3</sub>), 6.0 (s, 2H en -NH<sub>2</sub>, intercambio con D<sub>2</sub>O), 7.2-8.0 (m,

7H en naftaleno) y 8.3 (s, 1H, H en C<sub>6</sub>). El espectro de Masas (No. 3) presentó m/z 314 (M<sup>+</sup>, 100%) correspondiente al peso molecular, 316 (M+2, 34%) debido al cloro, 279 ([M<sup>+</sup> -35], 72%) y 233 ([279-46], 93%).

➤ **4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (6)**

Este compuesto es muy inestable, así que para poder obtener sus espectros se formó el clorhidrato correspondiente. El espectro de IR (No. 4) dio dos bandas en 3345 y 3462 cm<sup>-1</sup> de las aminas aromáticas (Ar-NH<sub>2</sub>), en 2567 y 3047 cm<sup>-1</sup> aparecieron las señales propias del clorhidrato (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 2000-1700 el anillo aromático (Ar) y en 1228 cm<sup>-1</sup> la banda del éter (Ar-O-R). Su espectro de RMN<sup>1</sup>H (No. 5) presentó señales en 3.3 (s, 4H de -NH<sub>2</sub>, intercambiables con D<sub>2</sub>O), 6.5 (s, 1H, H en C<sub>3</sub>), 6.8 (s, 1H, H de C<sub>6</sub>) y 6.6-8.4 (m, 7H de naftaleno). El espectro de Masas (No. 6) tuvo m/z de 284 (M<sup>+</sup>, 100%) que corresponde con el peso molecular, 284 ([M<sup>+</sup>+36], 87%), 232 ([248-16], 62%) y 157 ([M<sup>+</sup>+127], 12%) y 127 (naftil).

➤ **5-Cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (7)**

En su espectro de IR (No. 7) mostró una banda en 3053 cm<sup>-1</sup> de la amina secundaria (-NH), 2600 cm<sup>-1</sup> del mercapto (-SH), 2000-1660 cm<sup>-1</sup> del anillo aromático (Ar) y 1229 cm<sup>-1</sup> (Ar-O-R). El espectro de la RMN<sup>1</sup>H (No.8) presentó señales de 4.0-5.0 (2H de N y S, intercambiables con D<sub>2</sub>O), 6.9 (s, 1H, H de C<sub>4</sub>), 6.4 (s, 1H, H de C<sub>7</sub>), 6.6-8.2 (m, 7H del naftaleno). El espectro de Masas (No.9) tuvo m/z de 326 (M<sup>+</sup>, 100%) concordante con el peso molecular, 328 (M+2, 49%) y 291 ([M<sup>+</sup>+35], 63%)

➤ **5-Cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (8)**

El espectro de IR (No.10) del fasciolicida alfa mostró una señal muy ancha en 3402cm<sup>-1</sup> que corresponde a la amina secundaria (-NH), de 1980 a 1680 cm<sup>-1</sup> las bandas del anillo aromático (-Ar) y la banda del éter (Ar-O-R) en 1224cm<sup>-1</sup>. En el espectro de RMN<sup>1</sup>H (No.11) aparecieron señales en 3.0 (s, 3H del metilo), 7.2 (s, 1H, H de C<sub>4</sub>), 7.9 (s, 1H, H del C<sub>7</sub>), 6.7-



8.3 (m, 7H del naftaleno) y 9.0-9.5 (H del N). En el espectro de Masas (No.12) las m/z fueron de 340 (M+, 100%) que corresponde a su masa molecular, 342 (M+2, 35%) y 305 ([M+-35], 43%).

## 6.2 Desarrollo de la Forma Farmacéutica

Los resultados de las determinaciones analíticas aplicadas a las formulaciones 1 a 6 se presentan en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Determinaciones organolépticas y fisicoquímicas de las formulaciones 1, 2 y 3

Formulación	Viscosidad [cps] 25°C	Densidad [g/mL] 25°C	pH	Aspecto
1	82	1.0180	4.1	Suspensión color amarillo claro de fácil manejo y buen flujo.
2	3310	0.9950	4.2	Suspensión homogénea muy viscosa, color amarillo claro, de difícil flujo
3	2960	0.9830	4.0	Suspensión muy viscosa, color amarillo claro, de difícil flujo

Solo se probaron con el mebendazol.

Tabla 10. Determinaciones organolépticas y fisicoquímicas de las formulaciones 4, 5 y 6

Formulación	Viscosidad [cps] 25°C	Densidad [g/mL] 25°C	pH	Aspecto
4	---	---	5.6	Suspensión homogénea, color amarillo claro de muy fácil flujo.
5	30	1.0594	5.6	Suspensión homogénea, color amarillo claro, de fácil flujo.
6	260	1.0867	5.4	Suspensión color amarillo claro, con muy buen flujo y fácil manejo.
6(α)	164	1.0803	5.2	Suspensión color blanco, con muy buen flujo y fácil manejo.

La formulación 6(α) fue la definitiva y los datos que aparecen se refieren a los obtenidos con el fasciolicida alfa.

La formulación 1 después de 4 días (96 h), formó un sedimento difícil de resuspender (cake); y conforme siguió transcurriendo el tiempo, éste fue aumentando, haciendo prácticamente imposible el homogeneizado de la suspensión.

En cuanto a las formulaciones 2 y 3, su manejo resultó muy difícil debido a la alta viscosidad que presentaron. Tres meses después no formaron "cake". El aspecto de estas suspensiones en general es mejor que el de la formulación 1, pues éstas son más homogéneas. La formulación 4 después de 24 h, presentaba un volumen de sedimentación de 40 mL (de una muestra de 100mL), debido a tal velocidad de sedimentación, dicha formulación fue descartada como posible alternativa para formular al compuesto Alfa, pues se pretendía que el volumen de sedimentación fuera de cero después de la primera semana, posterior a la preparación.

La formulación 5 después de 24 h presentó un volumen de sedimentación de 98 mL, el cual se mantuvo constante a lo largo de 120 h. Después de 3 meses esta formulación presentó una excelente resuspendibilidad.

Para la formulación 6 se inició la sedimentación dos semanas después de su fabricación, el volumen de sedimentación después de 1 mes fue de 95 mL, el sobrenadante de la misma era de aspecto claro y después de 3 meses su resuspendibilidad fue excelente.

La formulación 6( $\alpha$ ) -que incorporó al compuesto alfa- inició su sedimentación a las tres semanas posteriores a su fabricación y su volumen de sedimentación después de un mes fue de 92 mL. El sobrenadante tenía un aspecto claro, es decir, sin pequeñas partículas dispersas en él y su viscosidad permitió un fácil manejo.

Las formulaciones 7 a 14 al estar en reposo presentaron una viscosidad considerablemente más alta, se "gelificaban". Sin embargo, después de una ligera agitación volvían a su condición líquida (comportamiento tixotrópico). Ninguna presentó sedimento después de 3 meses de su manufactura.

### 6.3 Valoración del Fasciolicida Alfa en la Suspensión

El método analítico utilizado para la cuantificación del alfa fue reportado por Vertiz, S.G.<sup>5</sup> y por Del Rivero<sup>8</sup>. Dado que en este trabajo no se pretendía cuantificar ningún metabolito del alfa como en el caso de los antes citados, se decidió reducir el tiempo de retención del compuesto. Así el tiempo de retención del fasciolicida alfa bajo las condiciones antes mencionadas fue de 8.4 min.

La integración de las áreas para la curva y para las muestras fue calculada por la integración del software; en las tablas 11 y 12 se muestran los datos de la curva promedio y los parámetros de la regresión lineal de la misma.

Tabla 11. Resultados de la curva de calibración (triplicado) del fasciolicida alfa.

Concentración [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Áreas Promedio	D.E.	C.V.
100	6 689 082	123 439	1.85
50	3 161 690	115 121	3.64
25	1 592 272	11 465	0.72
15	983 118	25 413	2.58
10	643 149	29 030	4.51

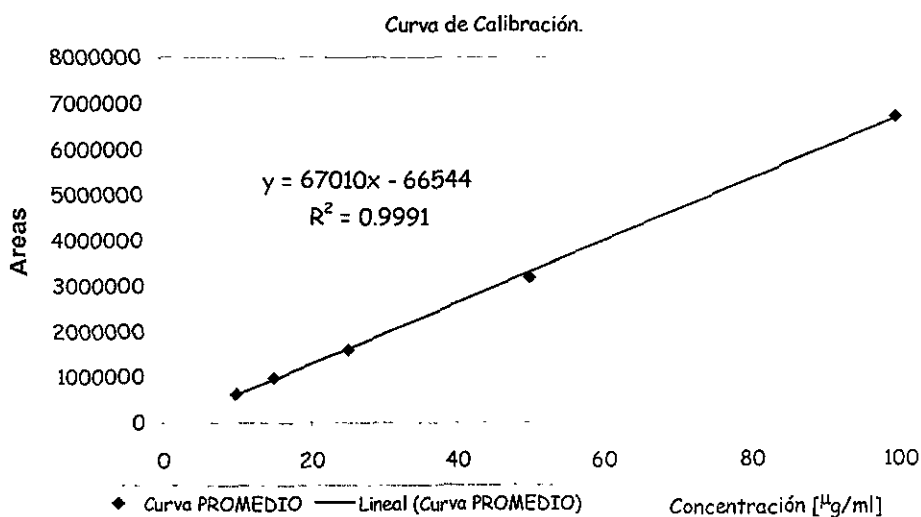
Tabla 12. Datos para la curva de calibración.

Parámetro	Valor obtenido.
Pendiente	67010
Ordenada	-66544
$R^2$	0.9991
R	0.9996

Las áreas obtenidas para las distintas extracciones fueron extrapoladas en la curva de calibración (ver gráfica 4) y los porcentajes de contenido del fasciolicida alfa en la extracción se muestran en la tabla 13. El porcentaje promedio de las tres extracciones es de 98.6%.

Tabla 13. Datos de las extracciones realizadas.

Extracción	Concentración [µg/ml]	Porcentaje
1	29.7	98.9
2	29.5	98.4
3	29.6	98.6
Promedio	29.6	98.6
D.E.	6817	
C.V.	0.36	



Gráfica 5. Curva de calibración promedio para la cuantificación del fasciolida alfa.

---

## 7 DISCUSIÓN

La fasciolosis -enfermedad parasitaria causada por el helminto *F. hepatica*- en animales de granja es un problema no solo en México, sino también en el ámbito mundial.<sup>2,11-13</sup> En la actualidad solamente el triclabendazol ha presentado resultados satisfactorios contra los estadios juveniles y adultos de este parásito.<sup>17</sup> Sin embargo, los recientes hallazgos del desarrollo de resistencia de la *F. hepatica* ante el tratamiento con triclabendazol en Australia, Irlanda, Escocia y Holanda hacen necesario el estudio de nuevas moléculas.<sup>32,33</sup>

El fasciolicida alfa, diseñado como resultado de un gran proyecto multidisciplinario, (destinado al estudio de la relación existente entre la estructura y la actividad de diversos bencimidazoles), mostró logros importantes en las pruebas *in vitro* e *in vivo* siendo las últimas donde se comprobó su potencial para eliminar tanto formas juveniles como adultas de la *F. hepatica*.<sup>6,7</sup>

La síntesis del fasciolicida alfa se pudo llevar a cabo siguiendo una metodología previamente descrita, así como incorporando algunos cambios para hacer posible el escalamiento. Al final de la síntesis se lograron obtener 150 g del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (fasciolicida alfa) con un buen rendimiento global (48.9%).

La diferencia en los puntos de fusión del compuesto 5 obtenido y el reportado (ver tabla 8) se debe posiblemente a la diferencia en los disolventes de recristalización, los cuales pudieron haber dado pie a la formación de cristales con distintas propiedades físicas. También es posible la existencia de polimorfos dada la estructura; esto podría explicar los diferentes puntos de fusión por diferente acomodo del  $\alpha$ -naftilo en la molécula.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la separación de los dos productos resultantes de la nitración (4,5-dicloro-2-nitroacetanilida y 3,4-dicloro-2-nitroacetanilida), es uno de los

pasos críticos de esta síntesis, ya que de no hacerlo ésta podría tomar rumbos muy diferentes. En este paso de nitración habría que estudiar el proceso a menor temperatura, por ejemplo a 0°C.

El aislamiento de la 4,5-dicloro-2-nitroacetanilida, no se pudo realizar solamente por el lavado con MeOH helado del crudo de la reacción de nitración, sino que también hubo la necesidad de realizar un lavado posterior al producto de la reacción de hidrólisis, razón por la que el rendimiento de esta última fue bajo.

En el paso siguiente, la sustitución nucleofílica con  $\alpha$ -naftol, fue importante el control de la temperatura, la cual se mantuvo entre 110-115 °C; de otra forma se obtienen productos secundarios difíciles de eliminar. El éter se purificó por maceración con metanol después de destilar la DMF a presión reducida.

Una variable que se aplicó para poder realizar la reducción de la 4-cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina en un solo lote, fue el uso de cloruro estanoso dihidratado, ya que con el equipo que se cuenta para la hidrogenación catalítica con Pd/C no es posible reducir lotes mayores a 40 g; además se corre el riesgo de hidrogenólisis del cloro.

En la última reacción de la ruta sintética se llevó a cabo una metilación, en la cual se tuvo que vigilar cuidadosamente la temperatura y la cantidad de yoduro de metilo adicionado, ya que un exceso de reactivo, o un aumento en la temperatura, lleva a la dimetilación.

La purificación del producto final representó tal vez el paso de mayor dificultad, pues aunque se habían realizado algunas pruebas, no se obtuvo el éxito deseado. Hasta este momento el tratamiento del producto de reacción con carbón activado a reflujo y posterior precipitación con MeOH helado es la mejor opción.

Con relación a la formulación del compuesto Alfa, se establecieron Procedimientos Normalizado de Operación para cada tipo de formulación (ver anexo 1, -PNO TF-A-001, PNO TF-A-002, PNO TF-A-003), siendo el PNO TF-A-002 el que proporcionó la suspensión de mejores características para la dosificación del fasciolicida alfa.

La formulación 1, utilizada previamente para estudios en ovinos, presentó la formación de una aglomerado que no fue posible resuspender, por lo que se presume que se trata de una suspensión defloculada.<sup>16,18</sup>

La formulación 6(α), presentó las características más adecuadas para la dosificación del fasciolicida alfa. La estabilidad física, así como las características del sobrenadante hacen pensar que se trata de una suspensión floculada; lo cual, se atribuye a la adición del caolín coloidal y del aerosil.<sup>30</sup> Esta suspensión tuvo una excelente apariencia y un muy buen manejo, lo cual facilita la administración para el ganado.

El pH de las formulaciones 1, 2 y 3 -pH = 4.1-, fue en promedio una unidad menor que el de las formulaciones 4, 5, 6 y 6(α) -pH = 5.4-, lo cual favorece que los parabenos lleven a cabo su función como conservadores en estas últimas, ya que está reportado que ejercen su acción como conservadores a pH entre 4 y 8.

Las formulaciones 7 a 14 incluyeron entre sus excipientes propilenglicol y carbopol, lo que dio lugar a suspensiones con propiedades tixotrópicas que permiten mantener al fármaco disperso cuando está en reposo y ser vertido fácilmente una vez que se agita. Se probaron tres distintos porcentajes de propilenglicol (PEG) 2, 5 y 10 %, siendo el último el más adecuado. En lo que se refiere a los distintos tipos de carbopol usado (974P y 971P), el 974P fue el que produjo las suspensiones de aspecto más homogéneo. La formulación alternativa para el mebendazol (formulación 13) presentó este comportamiento; sin embargo, al intentar aplicar el PNO TF-A-003 al fasciolicida alfa, los resultados no fueron

---

satisfactorios, pues se formó un precipitado al añadir la solución de los parabenos al fármaco previamente humectado en PEG.

El uso de un principio activo sustituto (mebendazol) del fasciolicida Alfa fue de considerable ayuda, en la caracterización y la investigación inicial de las diferentes formulaciones que se probarían con el compuesto Alfa. Sin embargo, no fue del todo extrapolable, pues no fue posible formular al fasciolicida Alfa según la formulación 13, como lo fue para el mebendazol.

En la parte de la cuantificación del fasciolicida alfa se encontró que la fase orgánica más conveniente para la extracción fue el acetato de etilo, y que el uso de 20 mL de fase acuosa saturada de sal y a pH de 8 permitió extraer al principio activo de la suspensión.

El resultado de la valoración del principio activo en la suspensión (98 %) cae perfectamente dentro de los límites que permite la USP para las suspensiones de mebendazol y albendazol (90-110 %).<sup>34</sup>

La valoración del fasciolicida alfa da soporte al PNO de manufactura del alfa, ya que con los resultados obtenidos de la valoración se confirma que el PNO efectivamente produce una suspensión que contiene la cantidad de fármaco que presume.

En este trabajo se integran los conocimientos adquiridos durante la carrera para poder sintetizar un compuesto de interés farmacéutico, para después desarrollar una forma farmacéutica estable y conveniente para su dosificación y por último se aplicó un método analítico para su valoración. Estos hechos aparte de ser importantes son muy satisfactorios en la formación profesional.



---

## 8 CONCLUSIONES

- El fasciolida alfa, resultado del diseño racional de nuevos fármacos hechos en nuestro país, es una molécula relativamente nueva, que puede en un futuro cercano convertirse en una buena opción para el tratamiento de la fasciolosis.
- El escalamiento de la síntesis a 150 g del 5-Cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (fasciolida alfa) fue realizado según la ruta propuesta inicialmente.
- Una suspensión fue desarrollada como la forma farmacéutica más conveniente para la dosificación del fasciolida alfa al ganado y fue establecido un Procedimiento Normalizado de Operación para la fabricación de ésta.
- Se obtuvo una formulación alternativa para la dosificación del mebendazol.
- Este trabajo puede ayudar a resolver uno de los problemas que atañen directa y gravemente al ganado, pudiendo evitar las cuantiosas pérdidas económicas a causa de la fasciolosis.

Con base en los resultados obtenidos por el fasciolida alfa en las pruebas *in vitro*, *in vivo*, y farmacocinéticas, se puede considerar al alfa como un posible sustituto del triclabendazol en el tratamiento de la fasciolosis veterinaria y humana. Lo cual es alentador para continuar los estudios de toxicidad; además, se propone llevar a cabo las pruebas de estabilidad y las determinaciones microbiológicas de la suspensión.

9.1 PROCEDIMIENTOS NORMALIZADOS DE OPERACIÓN

<b>SUSPENSIÓN DE MEBENDAZOL</b>			PNO TF-A-001 Manufactura																																															
			Formulación 1	A-001	Pag 1 de 5																																													
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M. S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B.	En vigor: Octubre del 2000																																															
			Sustituye a: Nuevo																																															
<p>Fecha de inicio: _____ Producto: _____</p> <p>Fecha de término: _____ Lote: _____</p> <p style="text-align: right;">Cantidad: _____</p> <p>1 -Tamaño estándar del lote: 1 L</p> <p>2 -Descripción: Suspensión color amarillo claro, homogénea, con un pH de entre 4.0 y 5.0, una viscosidad de 74-90 cps, y actividad antihelmíntica.</p> <p>3.-Formulación:</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">No. Clave</th> <th style="width: 15%;">No. Análisis</th> <th style="width: 30%;">Componente</th> <th style="width: 15%;">p/100 mL</th> <th style="width: 25%;">p/1 L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Metilparabeno</td> <td style="text-align: center;">0.02 g</td> <td style="text-align: center;">0.2 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Propilparabeno</td> <td style="text-align: center;">0.18 g</td> <td style="text-align: center;">1.8 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Sacarina sódica USP</td> <td style="text-align: center;">0.2 g</td> <td style="text-align: center;">2.0 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Pectina USP</td> <td style="text-align: center;">1.5 g</td> <td style="text-align: center;">15.0 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>CMC (baja viscosidad)</td> <td style="text-align: center;">0.5 g</td> <td style="text-align: center;">5.0 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>CMC (media viscosidad)</td> <td style="text-align: center;">0.5 g</td> <td style="text-align: center;">5.0 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Mebendazol</td> <td style="text-align: center;">10.0 g</td> <td style="text-align: center;">100.0 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>H<sub>2</sub>O purificada c.b.p.</td> <td style="text-align: center;">100 mL</td> <td style="text-align: center;">1 L</td> </tr> </tbody> </table>						No. Clave	No. Análisis	Componente	p/100 mL	p/1 L	_____	_____	Metilparabeno	0.02 g	0.2 g	_____	_____	Propilparabeno	0.18 g	1.8 g	_____	_____	Sacarina sódica USP	0.2 g	2.0 g	_____	_____	Pectina USP	1.5 g	15.0 g	_____	_____	CMC (baja viscosidad)	0.5 g	5.0 g	_____	_____	CMC (media viscosidad)	0.5 g	5.0 g	_____	_____	Mebendazol	10.0 g	100.0 g	_____	_____	H <sub>2</sub> O purificada c.b.p.	100 mL	1 L
No. Clave	No. Análisis	Componente	p/100 mL	p/1 L																																														
_____	_____	Metilparabeno	0.02 g	0.2 g																																														
_____	_____	Propilparabeno	0.18 g	1.8 g																																														
_____	_____	Sacarina sódica USP	0.2 g	2.0 g																																														
_____	_____	Pectina USP	1.5 g	15.0 g																																														
_____	_____	CMC (baja viscosidad)	0.5 g	5.0 g																																														
_____	_____	CMC (media viscosidad)	0.5 g	5.0 g																																														
_____	_____	Mebendazol	10.0 g	100.0 g																																														
_____	_____	H <sub>2</sub> O purificada c.b.p.	100 mL	1 L																																														

SUSPENSIÓN DE MEBENDAZOL			PNO TF-A-001 Manufactura	
			Formulación 1	
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M. S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B	A-001	Pag. 2 de 5
			En vigor: Octubre del 2000	
			Sustituye a: Nuevo	
<p>4. Material y Equipo:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 1 vaso de precipitados de vidrio de 2 L. (PYREX)</li> <li>➤ 3 vasos de precipitados de vidrio de 100 mL (PYREX).</li> <li>➤ 1 vaso de precipitados de vidrio de 500 mL (PYREX).</li> <li>➤ Espátula.</li> <li>➤ Pipeta Pasteur.</li> <li>➤ Termómetro de -10°C a 100°C.</li> <li>➤ Parrilla (Corning PC-420).</li> <li>➤ Agitador magnético ( 5 cm).</li> <li>➤ Agitador de vidrio.</li> <li>➤ Balanza (Mettler PK 36).</li> <li>➤ Potenciómetro (Hanna instruments, HI 8014).</li> <li>➤ Viscosímetro (Brookfield, Modelo RVT).</li> <li>➤ Ultra-turrax (JANKE &amp; KUNKEL T-45).</li> <li>➤ Picnómetro (25 mL)</li> </ul>				
<p>5. Seguridad:</p> <p>El personal involucrado en la manufactura y el control de la suspensión, debe portar bata (blanca, en buen estado, limpia y abotonada), cofia, cubrebocas y guantes de látex. No debe de portar ningún tipo de maquillaje o joyería y ha de usar zapatos cerrados. Debe seguir cuidadosamente todas las instrucciones e indicaciones de seguridad del equipo utilizado.</p>				
<p>6.-Procedimiento:</p>				
6.1.Verificar el orden y limpieza de la central de pesada.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad
6.2.Verificar la identidad de cada una de las materias primas.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad
6.3.Verificar el control de calidad de las materias primas.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad

SUSPENSIÓN DE MEBENDAZOL			PNO TF-A-001 Manufactura	
			Formulación 1	
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M. S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B.	A-001	Pag. 3 de 5
			En vigor: Octubre del 2000	
			Sustituye a: Nuevo	
6.4. Verificar las pesadas de cada una de las materias primas.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad
6.5. Identificar cada una de las materias primas pesadas.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad
6.6. Registrar el peso exacto de un vaso de precipitados de 2 L.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad
6.7. Verificar el orden y la limpieza del cubículo de pesadas, una vez terminado el proceso.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad
6.8. Regresar las materias primas al anaquel de origen, en el almacén de materia prima aprobada.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad
6.9. Verificar el orden y limpieza del cubículo de fabricación.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad
6.10. En el vaso de precipitados de 2 L (del que se registró el peso) se colocan 700 mL de agua purificada, calentar a una temperatura de 70-75°C, agregar el metil y propilparabeno: agitando magnéticamente (aproximadamente 700 rpm) hasta obtener la disolución total de los cristales. La parrilla se apaga y se agrega la sacarina sódica a dicha solución, manteniendo la agitación hasta la total disolución de ésta. La solución formada (A) se retira de la parrilla y deja enfriar a una temperatura de 40-45°C.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad

SUSPENSIÓN DE MEBENDAZOL			PNO TF-A-001 Manufactura	
			Formulación 1	
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M. S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B	A-001	Pag. 4 de 5
			En vigor: Octubre del 2000	
			Sustituye a: Nuevo	
<p>6.11. En un vaso de precipitados de 100 mL se depositan 100 mL de agua purificada y adiciona la pectina. Agitando manualmente se humecta dicho sólido hasta la desaparición total de los grumos.</p>				
			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
<p>6.12. Una vez que la solución A se encuentra a una temperatura entre 40-45 °C, se coloca una vez más sobre la parrilla (manteniendo este intervalo de temperatura), y se le adiciona la pectina humectada (paso 6.11). Agitar con el Ultra-turrax (aproximadamente 8000 rpm) hasta que los grumos de la pectina desaparezcan completamente (mezcla B).</p>				
			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
<p>6.13. En otro vaso de precipitados de 100mL se coloca la CMC de baja viscosidad con 50 mL de agua purificada. Mezclar manualmente hasta la desaparición total de los grumos.</p>				
			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
<p>6.14. Agregar la CMC de baja viscosidad humectada (paso 6.13) a la mezcla B. Mezclar con el Ultra-turrax (aproximadamente 8000 rpm) hasta que los grumos de la CMC desaparezcan completamente (mezcla C).</p>				
			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
<p>6.15. En un tercer vaso de precipitados de 100 mL se coloca la CMC de mediana viscosidad con 50 mL de agua purificada (40°C). Mezclar manualmente hasta la desaparición total de los grumos.</p>				
			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad

SUSPENSIÓN DE MEBENDAZOL			PNO TF-A-001 Manufactura									
Formulación 1			A-001	Pag. 5 de 5								
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M. S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B.	En vigor: Octubre del 2000									
			Sustituye a: Nuevo									
<p>6.16. Agregar la CMC de mediana viscosidad humectada (paso 6.15) a la mezcla C. Agitar con el Ultra-turrax (aproximadamente 8000 rpm) hasta que los grumos de la CMC desaparezcan completamente (mezcla D).</p> <p style="text-align: right;">_____ Vo. Bo. Operador      Vo. Bo. Control de Calidad</p>												
<p>6.17. Agregar lentamente el principio activo a la mezcla D y mantener la agitación del Ultra-turrax (aproximadamente 8000 rpm) hasta obtener su completa incorporación al medio. Aforar por peso a 1 L con agua purificada. Homogeneizar con el Ultra-turrax (8000 rpm) por 15 min. Para calcular el peso del aforo, la densidad de la suspensión es de 1.0180g/mL.</p> <p style="text-align: right;">_____ Vo. Bo. Operador      Vo. Bo. Control de Calidad</p>												
<p>7.-Registros del aforo:</p> <p>Peso del vaso de precipitados de 1L: _____</p> <p>Aforo a 1L: <math>d = 1.0180 \text{ g/mL} * 1000 \text{ mL} = 1018.0 \text{ g}</math></p> <p>Lectura de la balanza = Peso de la suspensión + Peso del vaso de precipitados de 1 L</p> <p style="text-align: center;">_____ = _____ + _____</p>												
<p>8.-Determinaciones del producto a granel:</p> <p>Apariencia _____</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 60%;">Determinación</th> <th style="width: 40%;">Valor Esperado:</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Viscosidad: _____ La viscosidad se determina con la aguja # 1, a 50 rpm</td> <td style="text-align: center;">74 - 90 cps</td> </tr> <tr> <td>pH _____</td> <td style="text-align: center;">4.0 - 5.0</td> </tr> <tr> <td>Densidad _____</td> <td style="text-align: center;">0.9162 - 1.1198 g/mL</td> </tr> </tbody> </table>					Determinación	Valor Esperado:	Viscosidad: _____ La viscosidad se determina con la aguja # 1, a 50 rpm	74 - 90 cps	pH _____	4.0 - 5.0	Densidad _____	0.9162 - 1.1198 g/mL
Determinación	Valor Esperado:											
Viscosidad: _____ La viscosidad se determina con la aguja # 1, a 50 rpm	74 - 90 cps											
pH _____	4.0 - 5.0											
Densidad _____	0.9162 - 1.1198 g/mL											
<p>9.-Observaciones:</p> <p>_____</p> <p>_____</p>												

SUSPENSIÓN DEL FASCIOLICIDA ALFA			PNO TF-A-002 Manufactura																																																			
Formulación 6(a)			A-002	Pag. 1 de 5																																																		
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M. S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B.	En vigor: Septiembre del 2000																																																			
			Sustituye a: PNO TF-A-001																																																			
<p>Fecha de inicio: _____ Producto: _____</p> <p>Fecha de término: _____ Lote: _____</p> <p style="text-align: right;">Cantidad: _____</p> <p>1.-Tamaño estándar del lote: 1 L</p> <p>2.-Descripción: Suspensión color blanco, homogénea, físicamente estable, de viscosidad de 148-182 cps, y de fácil manejo y administración.</p> <p>3.-Formulación:</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">No. Clave</th> <th style="width: 15%;">No. Análisis</th> <th style="width: 30%;">Componente</th> <th style="width: 15%;">p/100 mL</th> <th style="width: 25%;">p/1 L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Metilparabeno</td> <td style="text-align: center;">0.02 g</td> <td style="text-align: center;">0.2 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Propilparabeno</td> <td style="text-align: center;">0.18 g</td> <td style="text-align: center;">1.8 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Sacarina sódica USP</td> <td style="text-align: center;">0.2 g</td> <td style="text-align: center;">2.0 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>CMC (baja viscosidad)</td> <td style="text-align: center;">0.5 g</td> <td style="text-align: center;">5.0 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>CMC (media viscosidad)</td> <td style="text-align: center;">0.5 g</td> <td style="text-align: center;">5.0 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Caolín coloidal</td> <td style="text-align: center;">7.5 g</td> <td style="text-align: center;">75.0 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Aerosil 200</td> <td style="text-align: center;">1.5 g</td> <td style="text-align: center;">15.0 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Fasciolicida alfa</td> <td style="text-align: center;">10.0 g</td> <td style="text-align: center;">100.0 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>H<sub>2</sub>O purificada c.b.p.</td> <td style="text-align: center;">100 mL</td> <td style="text-align: center;">1 L</td> </tr> </tbody> </table>					No. Clave	No. Análisis	Componente	p/100 mL	p/1 L	_____	_____	Metilparabeno	0.02 g	0.2 g	_____	_____	Propilparabeno	0.18 g	1.8 g	_____	_____	Sacarina sódica USP	0.2 g	2.0 g	_____	_____	CMC (baja viscosidad)	0.5 g	5.0 g	_____	_____	CMC (media viscosidad)	0.5 g	5.0 g	_____	_____	Caolín coloidal	7.5 g	75.0 g	_____	_____	Aerosil 200	1.5 g	15.0 g	_____	_____	Fasciolicida alfa	10.0 g	100.0 g	_____	_____	H <sub>2</sub> O purificada c.b.p.	100 mL	1 L
No. Clave	No. Análisis	Componente	p/100 mL	p/1 L																																																		
_____	_____	Metilparabeno	0.02 g	0.2 g																																																		
_____	_____	Propilparabeno	0.18 g	1.8 g																																																		
_____	_____	Sacarina sódica USP	0.2 g	2.0 g																																																		
_____	_____	CMC (baja viscosidad)	0.5 g	5.0 g																																																		
_____	_____	CMC (media viscosidad)	0.5 g	5.0 g																																																		
_____	_____	Caolín coloidal	7.5 g	75.0 g																																																		
_____	_____	Aerosil 200	1.5 g	15.0 g																																																		
_____	_____	Fasciolicida alfa	10.0 g	100.0 g																																																		
_____	_____	H <sub>2</sub> O purificada c.b.p.	100 mL	1 L																																																		

<b>SUSPENSIÓN DEL FASCIOLICIDA ALFA</b> Formulación 6(α)			PNO TF-A-002 Manufactura	
			A-002	Pag. 2 de 5
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M.S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B.	En vigor: Septiembre del 2000	
			Sustituye a: PNO TF-A-001	

**4. Material y Equipo:**

- 1 vaso de precipitados de vidrio de 2 L (PYREX).
- 1 vaso de precipitados de vidrio de 1 L (PYREX).
- 1 vaso de precipitados de vidrio de 500 mL (PYREX).
- Espátula.
- Pipeta Pasteur.
- Termómetro de -10°C a 100°C.
- Parrilla (Corning PC-420).
- Agitador magnético ( 5 cm).
- Agitador de vidrio.
- Balanza (Mettler PK 36).
- Potenciómetro (Hanna instruments, HI 8014).
- Viscosímetro (Brookfield, Modelo RVT).
- Ultra-turrax (JANKE & KUNKEL T-45).
- Picnómetro (25 mL)

**5. Seguridad:**

El personal involucrado en la manufactura y el control de la suspensión, debe portar bata (blanca, en buen estado, limpia y abotonada), cofia, cubrebocas y guantes de látex.

No debe de portar ningún tipo de maquillaje o joyería y ha de usar zapatos cerrados. Deben seguir cuidadosamente todas las instrucciones e indicaciones de seguridad del equipo utilizado.

**6.-Procedimiento:**

6.1.Verificar el orden y limpieza de la central de pesada.

\_\_\_\_\_  
Vo. Bo. Operador

\_\_\_\_\_  
Vo. Bo. Control de  
Calidad

6.2.Verificar la identidad de cada una de las materias primas.

\_\_\_\_\_  
Vo. Bo. Operador

\_\_\_\_\_  
Vo. Bo. Control de  
Calidad

6.3.Verificar el control de calidad que las materias primas.

\_\_\_\_\_  
Vo. Bo. Operador

\_\_\_\_\_  
Vo. Bo. Control de  
Calidad



SUSPENSION DEL FASCIOLICIDA ALFA Formulación 6(α)			PNO TF-A-002 Manufactura	
			A-002	Pag. 3 de 6
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M.S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B	En vigor Septiembre del 2000	
			Sustituye a: PNO TF-A-001	
6.4. Verificar las pesadas de cada una de las materias primas.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad
6.5. Identificar cada una de las de las materias primas pesadas.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad
6.6. Registrar el peso exacto de un vaso de precipitados de 2 L.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad
6.7. Verificar el orden y la limpieza del cubículo de pesadas, una vez terminado el proceso.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad
6.8. Regresar las materia primas al anaquel de origen, en el almacén de materia prime aprobada.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad
6.9 Verificar el orden y limpieza del cubículo de fabricación.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad
6.10. En un vaso de precipitados de 1 L se colocan 700 mL de agua purificada, calentar a una temperatura de 70-75°C, agregar los parabenos; agitando magnéticamente (aproximadamente 700 rpm) hasta obtener la disolución total de los cristales. La parrilla se apaga y se agrega la sacarina sódica a dicha solución, manteniendo la agitación hasta la total disolución de ésta. La solución formada (A) se retira de la parrilla y deja enfriar a una temp. de 40-45°C.			_____	_____
			Vo. Bo. Operador	Vo. Bo. Control de Calidad

<b>SUSPENSION DEL FASCIOLICIDA ALFA</b> Formulación 6(α)			PNO TF-A-002 Manufactura	
			Pag. 4 de 5	Pag. 4 de 6
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M.S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B.	En vigor Septiembre del 2000	
			Sustituye a: PNO TF-A-001	
6.11. En un vaso de precipitados de 2 L (vaso del que se registró el peso) se colocan las CMC's y 100 mL de agua purificada. Agitando manualmente se humecta dicho sólido hasta la desaparición total de los grumos.				
			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
6.12. La solución A se adiciona a las CMC's humectadas (paso 6.11) y agitar magnéticamente (aproximadamente 1000rpm) hasta que los grumos desaparezcan; mantener la mezcla entre 40-45 °C (mezcla B).				
			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
6.13. Agregar lentamente el Caolín a la mezcla B, mantener la agitación y temperatura del paso anterior.				
			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
6.14. Agregar el Aerosil lentamente a la mezcla B con agitación y manteniendo la temperatura (40-45°C).				
			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad



<b>SUSPENSIÓN DEL FASCIOLICIDA ALFA</b>			PNO TF-A-002 Manufactura	
Formulación 6(α)			A-002	Pag. 6 de 6
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M. S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B.	En vigor: Septiembre del 2000	
			Sustituye a: PNO TF-A-001	

7-Registros del aforo:

Peso del vaso de precipitados de 1L: \_\_\_\_\_

Aforo a 1L: 1.0803 g/mL \*1000 mL= 1080.3 g

Lectura de la balanza = Peso de la suspensión + Peso del vaso de precipitado de 1 L

= \_\_\_\_\_ + \_\_\_\_\_

9.-Determinaciones del producto a granel:

Apariencia \_\_\_\_\_

	Valor Esperado:
Viscosidad: _____ La viscosidad se determina con la aguja # 1, a 50 rpm. Temp. 20 °C	148-182 cps
pH _____	5.0-5.5
Densidad _____ Usando el picnómetro.	0.9723-1.1883 g/mL

11.-Observaciones:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

<b>SUSPENSIÓN DE MEBENDAZOL</b>			PNO TF-A-003 Manufactura																																									
Formulación 13			A-003	Pag. 1 de 5																																								
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M. S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B.	En vigor: Octubre del 2000																																									
			Sustituye a: Nuevo																																									
<p>Fecha de inicio: _____ Producto: _____</p> <p>Fecha de término: _____ Lote: _____</p> <p style="text-align: right;">Cantidad: _____</p> <p>1.-Tamaño estándar del lote: 1 L</p> <p>2.-Descripción: Suspensión color amarillo claro que presenta una apariencia gelatinosa antes de ser agitada, homogénea y actividad antihelmíntica.</p> <p>3.-Formulación:</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 15%;">No. Clave</th> <th style="width: 15%;">No. Análisis</th> <th style="width: 30%;">Componente</th> <th style="width: 15%;">p/100mL</th> <th style="width: 25%;">p/1L</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Metilparabeno</td> <td style="text-align: center;">0.02 g</td> <td style="text-align: center;">0.2 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Propilparabeno</td> <td style="text-align: center;">0.18 g</td> <td style="text-align: center;">1.8 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Sacarina sódica USP</td> <td style="text-align: center;">0.2 g</td> <td style="text-align: center;">2.0 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Propilenglicol</td> <td style="text-align: center;">10mL</td> <td style="text-align: center;">100mL</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Carbopol (971P/974P)</td> <td style="text-align: center;">0.15 g</td> <td style="text-align: center;">1.5 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>Principio activo</td> <td style="text-align: center;">10.0 g</td> <td style="text-align: center;">100.0 g</td> </tr> <tr> <td>_____</td> <td>_____</td> <td>H<sub>2</sub>O purificada c.b.p.</td> <td style="text-align: center;">100 mL</td> <td style="text-align: center;">1 L</td> </tr> </tbody> </table>					No. Clave	No. Análisis	Componente	p/100mL	p/1L	_____	_____	Metilparabeno	0.02 g	0.2 g	_____	_____	Propilparabeno	0.18 g	1.8 g	_____	_____	Sacarina sódica USP	0.2 g	2.0 g	_____	_____	Propilenglicol	10mL	100mL	_____	_____	Carbopol (971P/974P)	0.15 g	1.5 g	_____	_____	Principio activo	10.0 g	100.0 g	_____	_____	H <sub>2</sub> O purificada c.b.p.	100 mL	1 L
No. Clave	No. Análisis	Componente	p/100mL	p/1L																																								
_____	_____	Metilparabeno	0.02 g	0.2 g																																								
_____	_____	Propilparabeno	0.18 g	1.8 g																																								
_____	_____	Sacarina sódica USP	0.2 g	2.0 g																																								
_____	_____	Propilenglicol	10mL	100mL																																								
_____	_____	Carbopol (971P/974P)	0.15 g	1.5 g																																								
_____	_____	Principio activo	10.0 g	100.0 g																																								
_____	_____	H <sub>2</sub> O purificada c.b.p.	100 mL	1 L																																								

<b>SUSPENSIÓN DE MEBENDAZOL</b>			PNO TF-A-003 Manufactura	
Formulación 13			A-003	Pag. 2 de 5
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M. S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B	En vigor: Octubre del 2000	
			Sustituye a: Nuevo	
<p><b>4. Material y Equipo:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ 3 vasos de precipitados de vidrio de 100 mL (PYREX).</li> <li>➤ 1 vaso de precipitados de vidrio de 250 mL (PYREX).</li> <li>➤ Espátula.</li> <li>➤ Pipeta Pasteur.</li> <li>➤ Termómetro de -10°C a 100°C.</li> <li>➤ Parrilla (Corning PC-420).</li> <li>➤ Agitador magnético (5 cm).</li> <li>➤ Agitador de vidrio.</li> <li>➤ Balanza (Mettler PK 36).</li> <li>➤ Potenciómetro (Hanna instruments, HI 8014).</li> <li>➤ Viscosímetro (Brookfield, Modelo RVT).</li> <li>➤ Picnómetro (25 mL)</li> </ul>				
<p><b>5. Seguridad:</b></p> <p>El personal involucrado en la manufactura y el control de la suspensión, debe portar bata (blanca, en buen estado, limpia y abotonada), cofia, cubrebocas y guantes de látex.</p> <p>No debe de portar ningún tipo de maquillaje o joyería y ha de usar zapatos cerrados. Debe seguir cuidadosamente todas las instrucciones e indicaciones de seguridad del equipo utilizado</p>				
<p><b>6.-Procedimiento:</b></p>				
<p>6.1. Verificar el orden y limpieza de la central de pesada.</p>			<p>Vo. Bo. Operador</p>	<p>Vo. Bo. Control de Calidad</p>
<p>6.2. Verificar la identidad de cada una de las materias primas.</p>			<p>Vo. Bo. Operador</p>	<p>Vo. Bo. Control de Calidad</p>
<p>6.3. Verificar el control de calidad de las materias primas.</p>			<p>Vo. Bo. Operador</p>	<p>Vo. Bo. Control de Calidad</p>

SUSPENSIÓN DE MEBENDAZOL Formulación 13			PNO TF-A-003 Manufactura	
			A-003	Pag 3 de 5
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M. S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B.	En vigor: Octubre del 2000	
			Sustituye a: Nuevo	
6.4. Verificar las pesadas de cada una de las materias primas.			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
6.5. Identificar cada una de las materias primas pesadas.			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
6.6. Registrar el peso exacto de un vaso de precipitados de 2 L.			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
6.7. Verificar el orden y la limpieza del cubículo de pesadas, una vez terminado el proceso.			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
6.8. Regresar las materia primas al anaquel de origen, en el almacén de materia prima aprobada.			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
6.9. Verificar el orden y limpieza del cubículo de fabricación.			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
6.10. En un vaso de precipitados de 250 mL se colocan 70 mL de agua purificada, calentar a una temperatura de 70-75°C, agregar los parabenos; agitando magnéticamente (aproximadamente 700 rpm) hasta obtener la disolución total de los cristales. La parrilla se apaga y la solución formada (A) se retira de la parrilla y deja enfriar a una temp. de 40-45°C.			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad

SUSPENSIÓN DE MEBENDAZOL			PNO TF-A-003 Manufactura	
			Formulación 13	
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M. S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B.	A-003	Pag. 4 de 5
			En vigor: Octubre del 2000	
			Sustituye a: Nuevo	
<p>6.11. En otro vaso de precipitados de 250 mL se colocan 10 g del principio activo y 10 mL de propilenglicol (PEG). Agitando manualmente se humecta dicho sólido hasta la desaparición total de los grumos (mezcla C).</p>				
			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
<p>6.12. Agregar el Carbopol 974P a la mezcla A, agitar magnéticamente (900 rpm) y mantener a una temperatura de 40-45°C. Una vez que se incorpora totalmente el carbopol se retira de la parrilla (mezcla B).</p>				
			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
<p>6.13 La mezcla B se adiciona lentamente a la mezcla C (paso 6.11) y se mantiene en agitación magnética (aproximadamente 1000 rpm) hasta que se alcance la homogeneidad.</p>				
			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
<p>6.14. Aforar a 100 mL con agua purificada. Homogeneizar con agitación magnética por 15 min (aproximadamente 1000 rpm).</p>				
			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad
<p>6.15. Dejar enfriar a 25°C y determinar la densidad, viscosidad, pH y apariencia.</p>				
			_____ Vo. Bo. Operador	_____ Vo. Bo. Control de Calidad



<b>SUSPENSIÓN DE MEBENDAZOL</b>			PNO TF-A-003 Manufactura	
			Formulación 13	A-003
Escrita por: D. Tamayo E.	Revisado por: M. S. Alpizar	Aprobado por: R. Castillo B.	En vigor: Octubre del 2000	
			Sustituye a: Nuevo	

8.-Determinaciones del producto a granel:

Apariencia \_\_\_\_\_

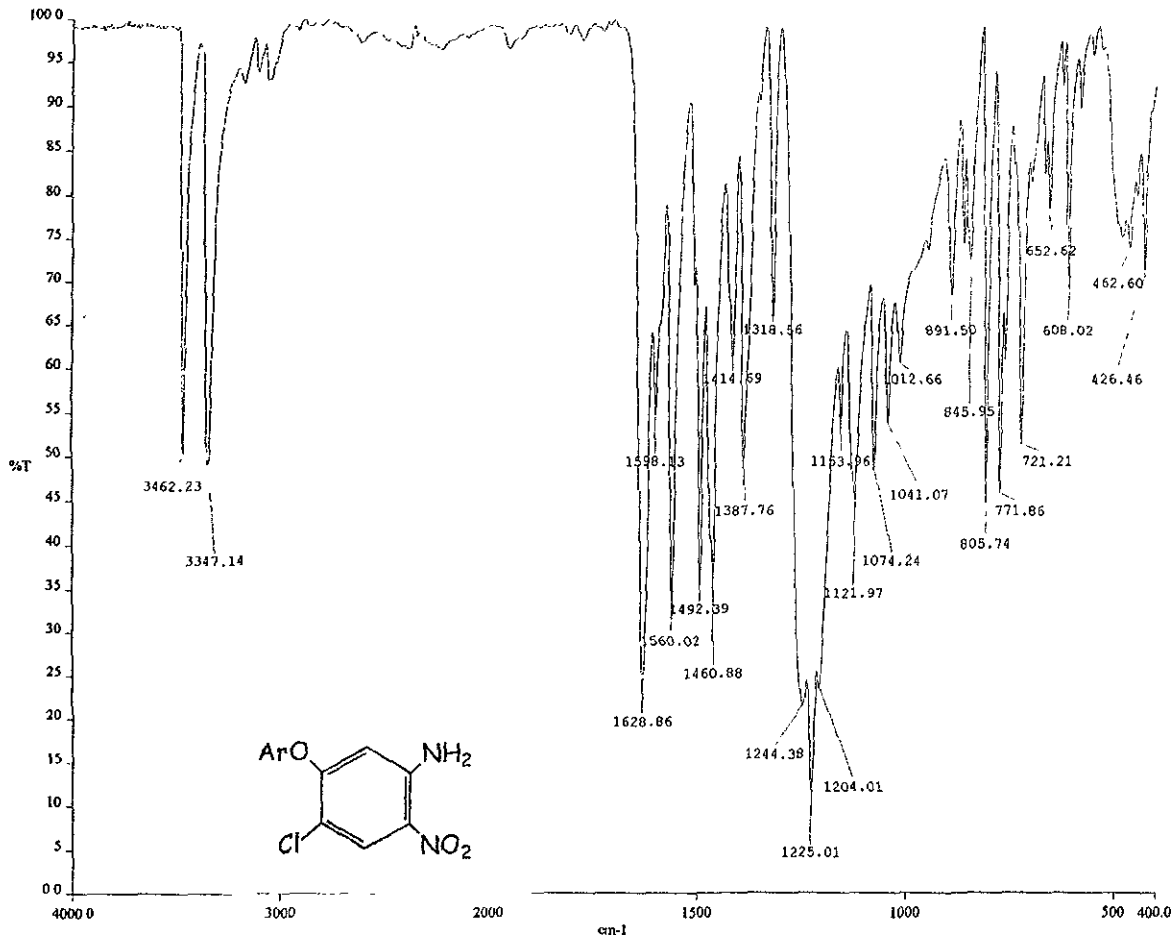
Determinación	Valor Esperado:
pH _____	4.0 - 5.0
Densidad _____ Usando el picnómetro.	0.9221-1.1270 g/mL

9 -Observaciones:

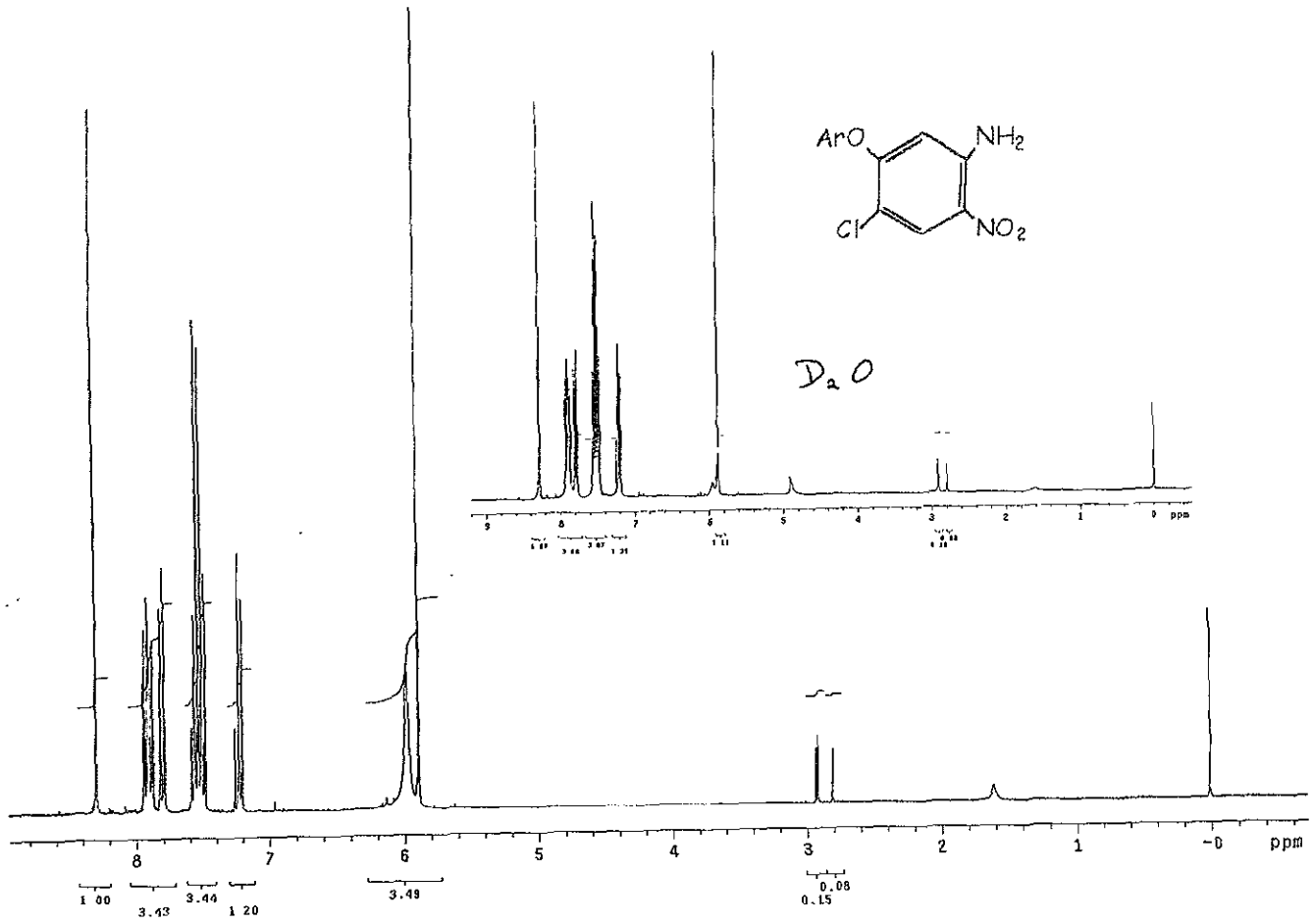
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



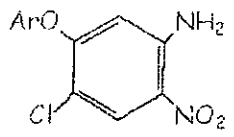
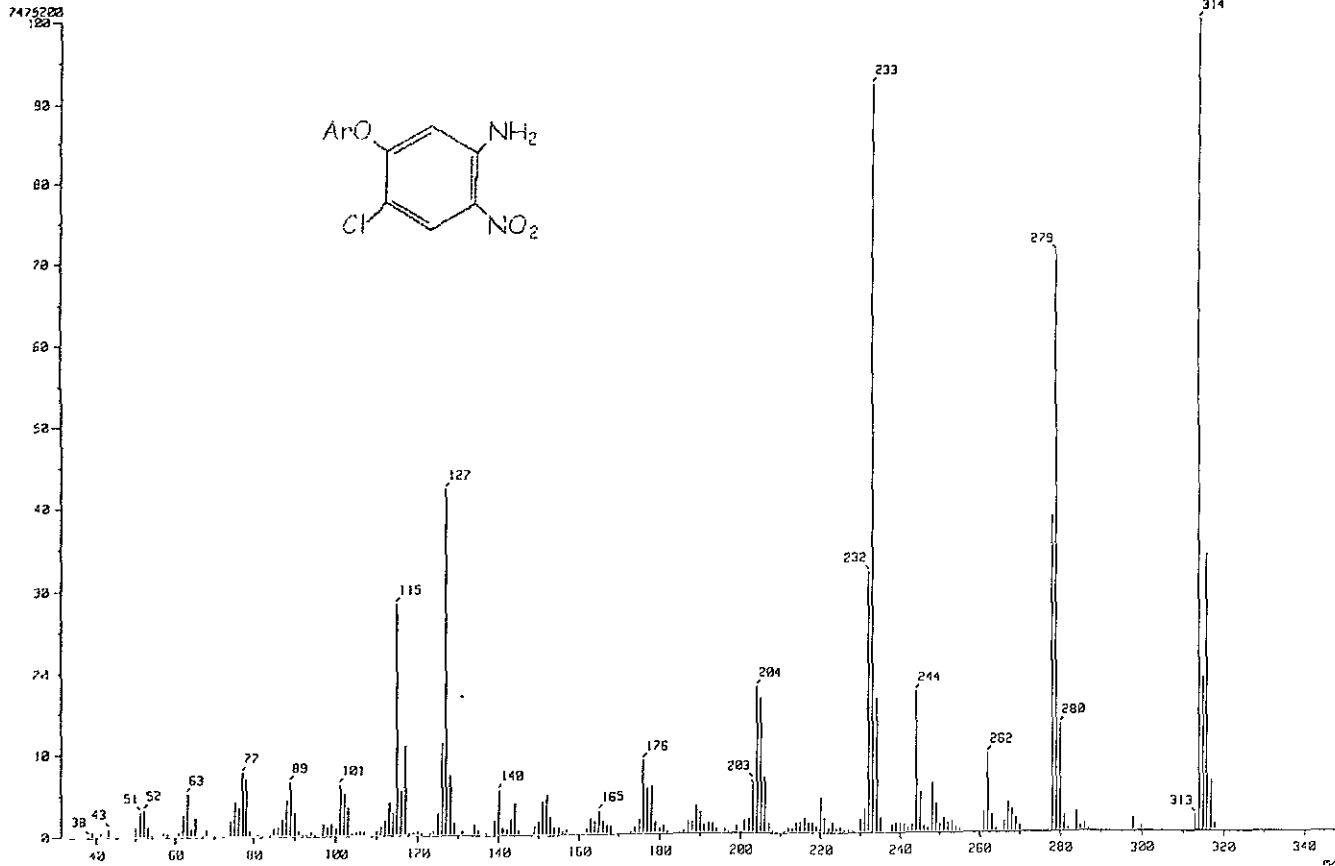
ESPECTRO NO. 1: 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (5).



ESPECTRO NO. 2 (DMSO): 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (5).

(Mass Spectrum)  
RT : 0.66 min  
Ion Mode : EI+

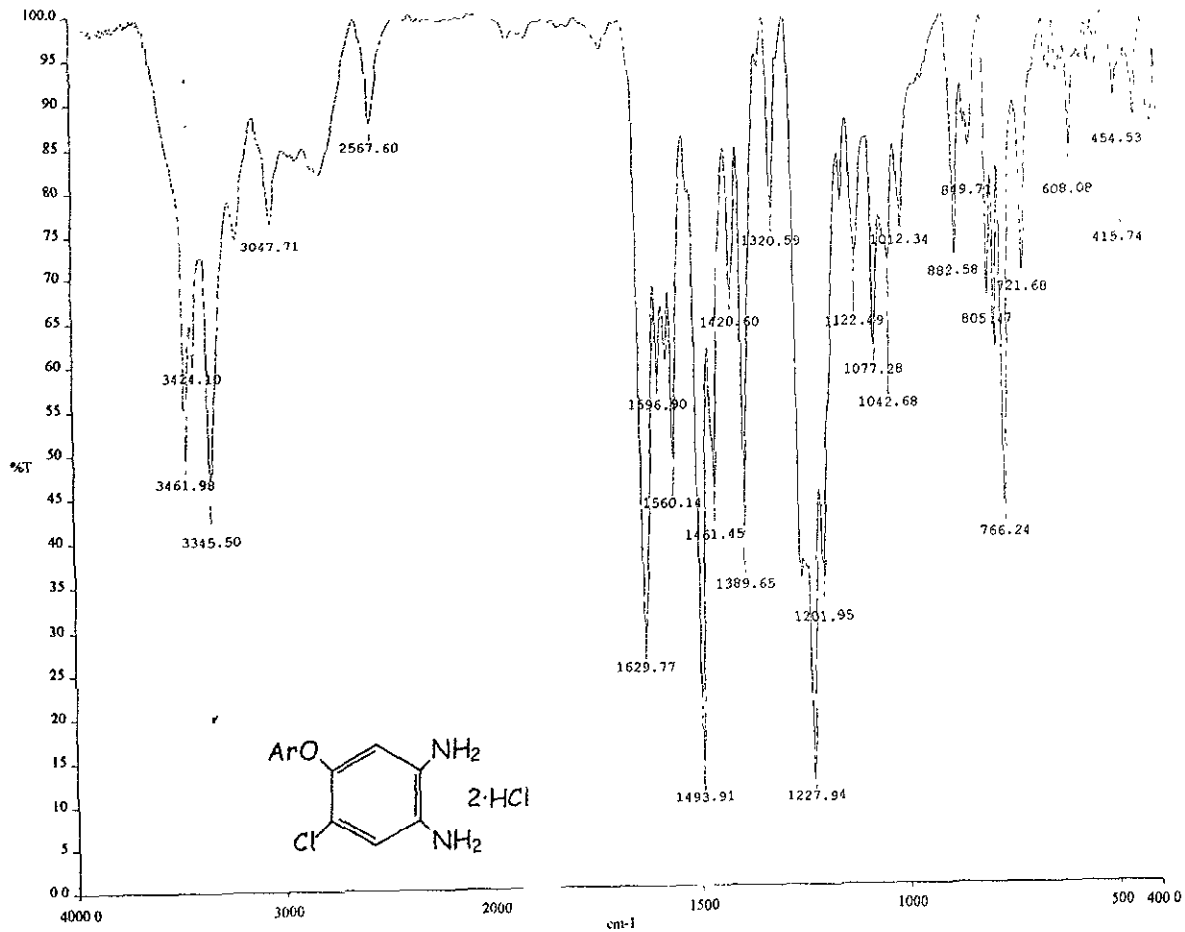
Scan : (24,27)-(71,97)-(4,12) Temp : 19.7 deg.C  
Int. : 712.89



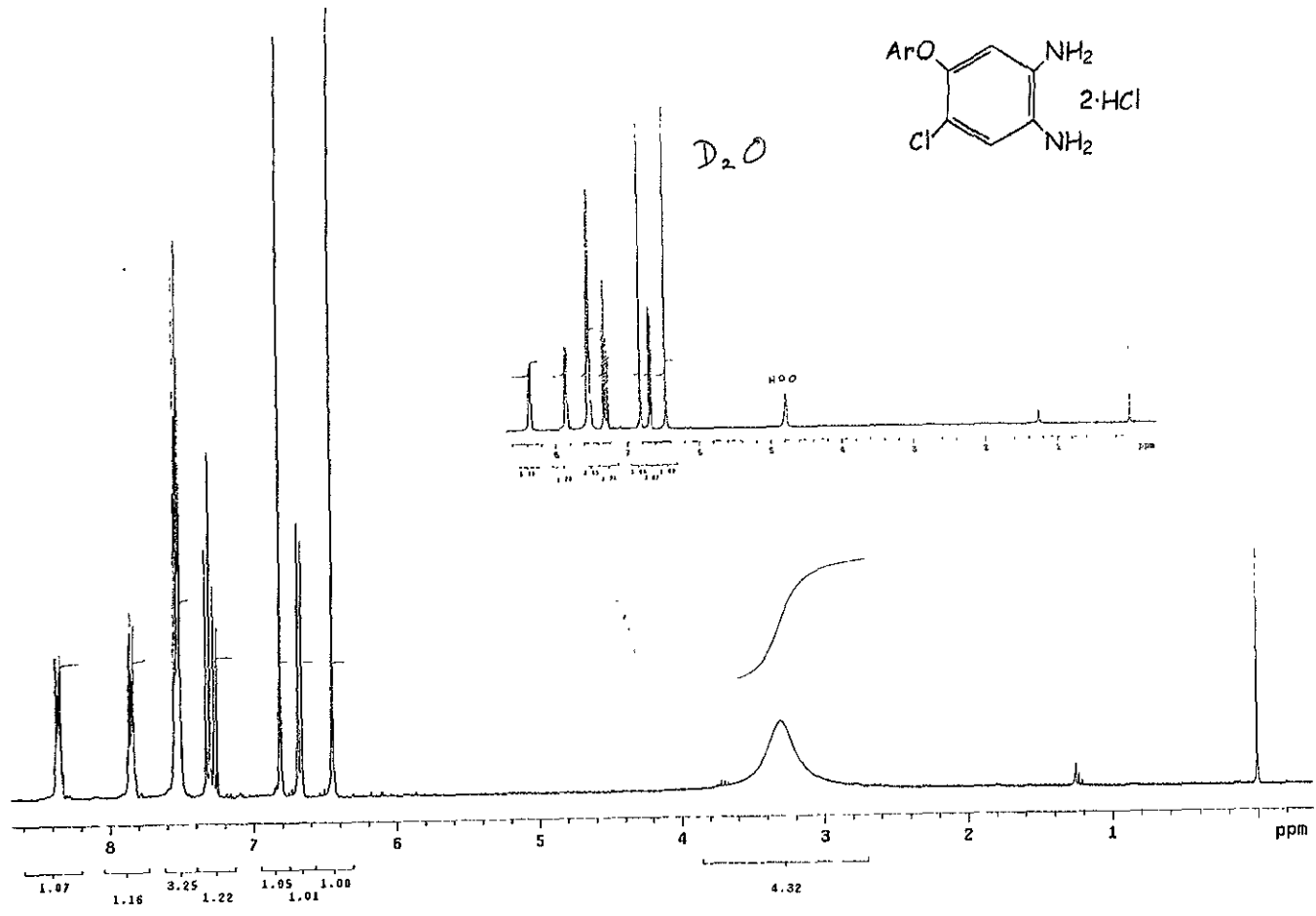
81

ESPECTRO NO. 3: 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-2-nitroanilina (5).

APENDICE ESPECTROS



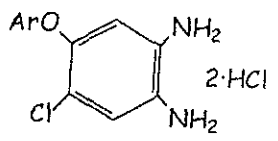
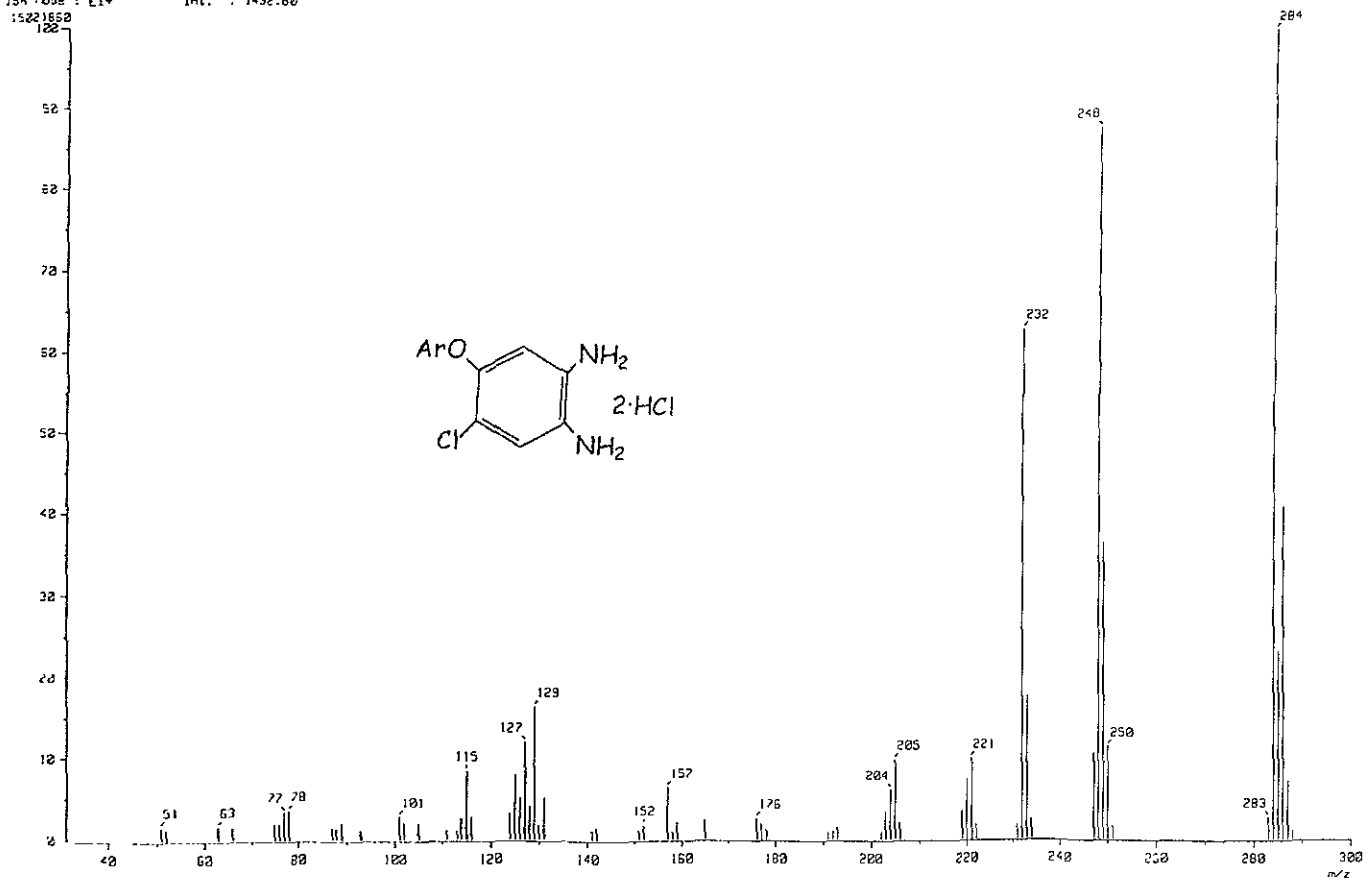
ESPECTRO NO. 4: 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (6).



ESPECTRO NO. 5 ( $\text{CDCl}_3$ ): 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (6).

[ Mass Spectrum ]  
RT : 1.58 min  
Ion Mode : EI+

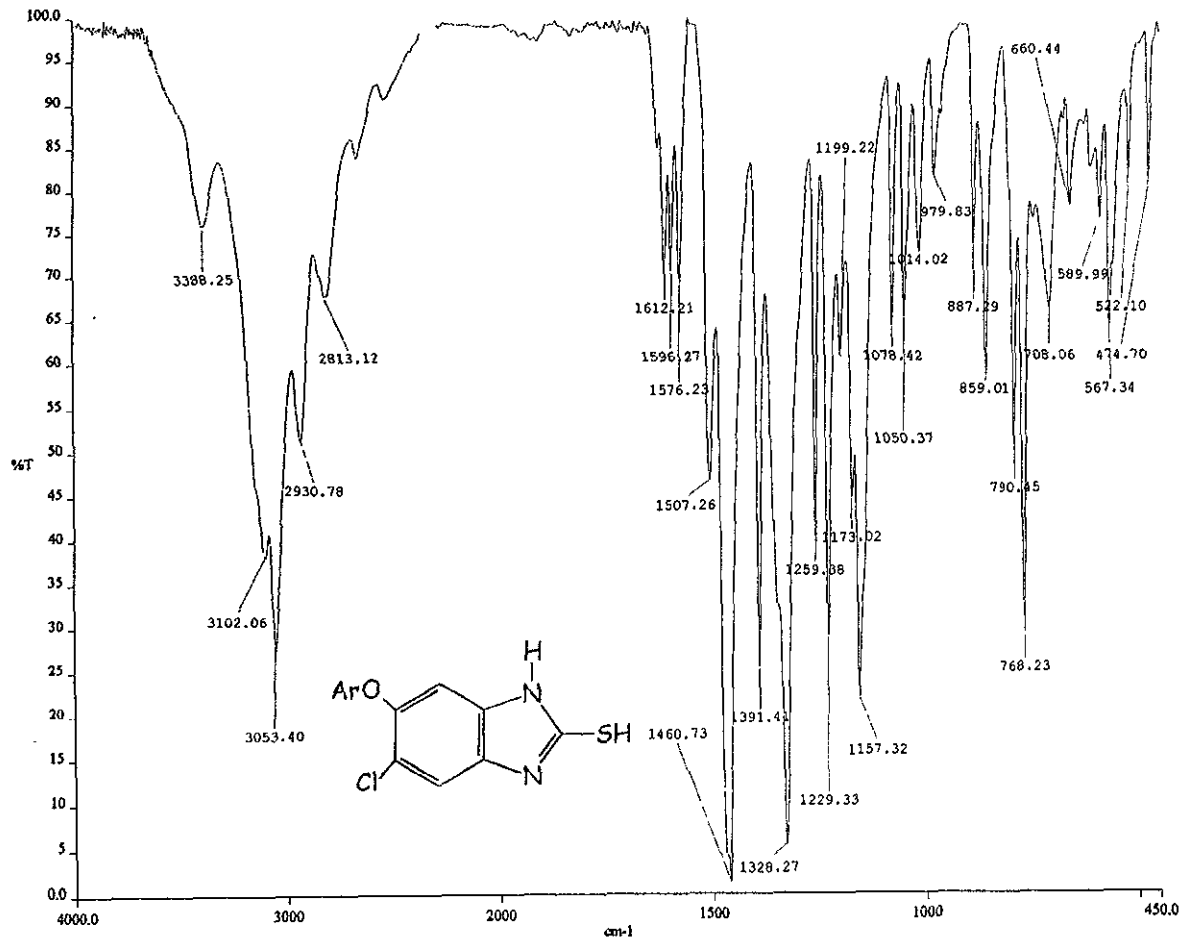
Scan# : (45,62)-(4,15)-(124,244) Temp : 129.4 deg.C  
Int. : 1432.60



65

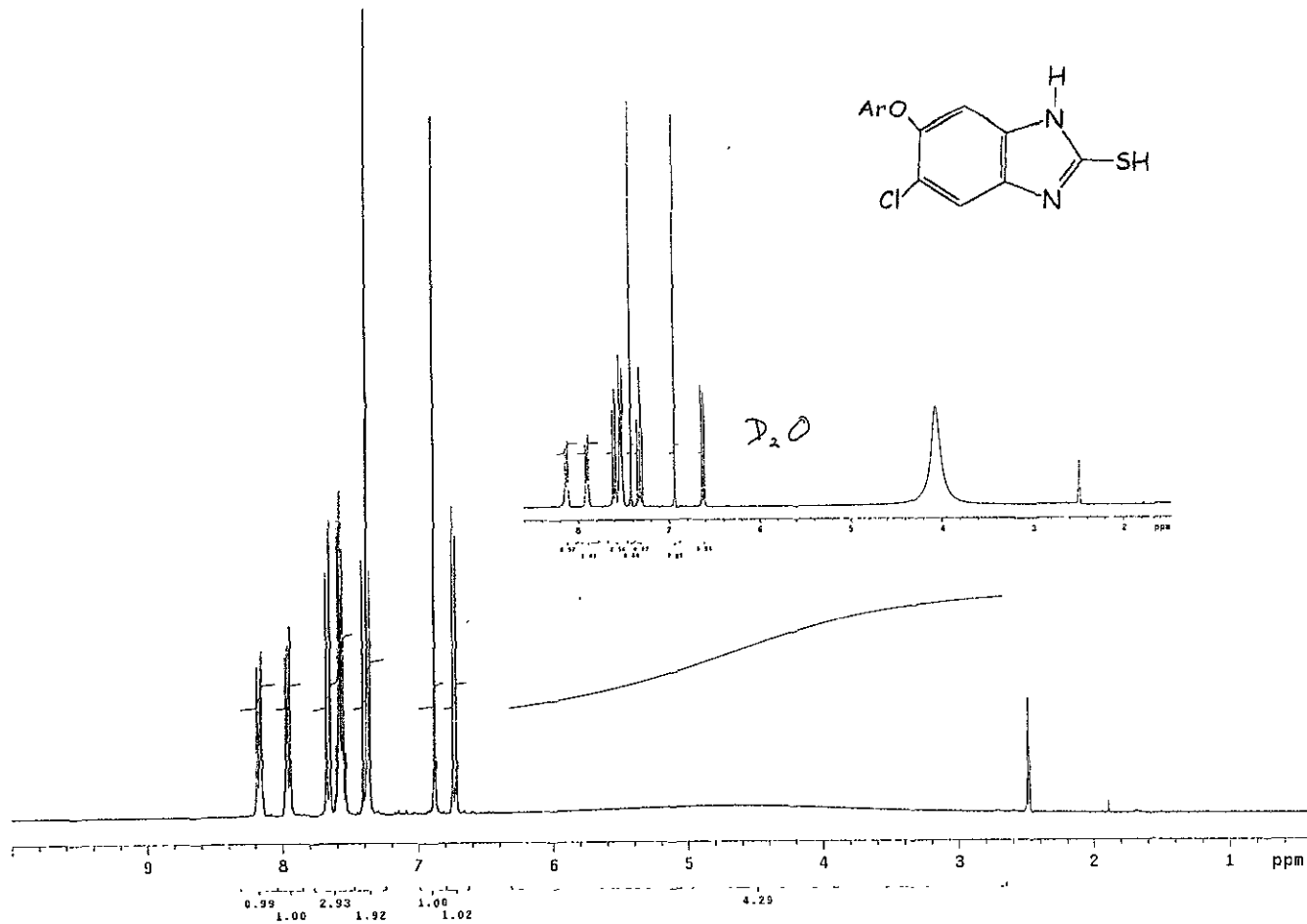
ESPECTRO NO. 6: 4-Cloro-5-(1-naftiloxi)-1,2-fenilendiamina (6).

APÉNDICE ESPECTROS



ESPECTRO NO. 7: 5-Cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (7).

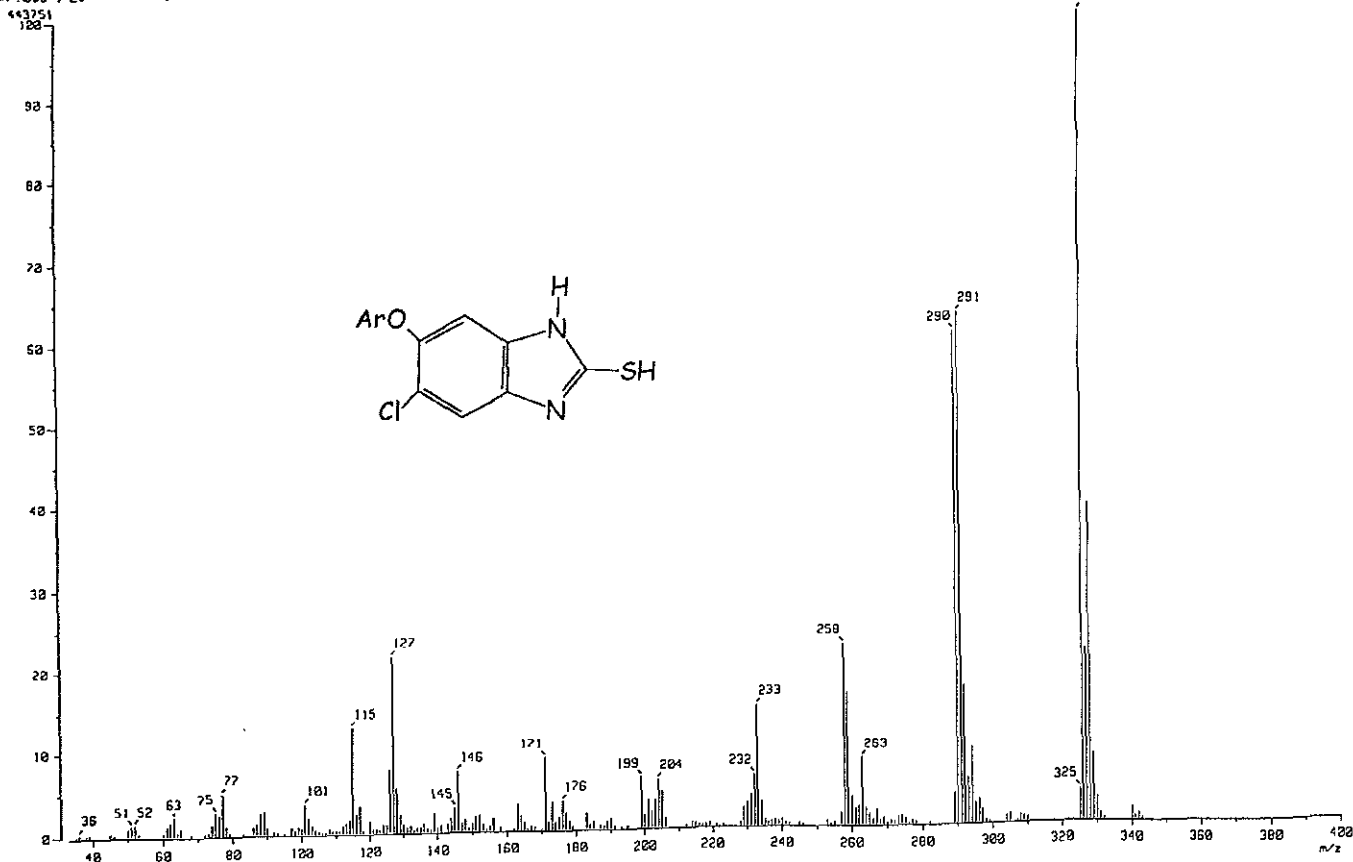




ESPECTRO NO. 8 (DMSO): 5-Cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (7).

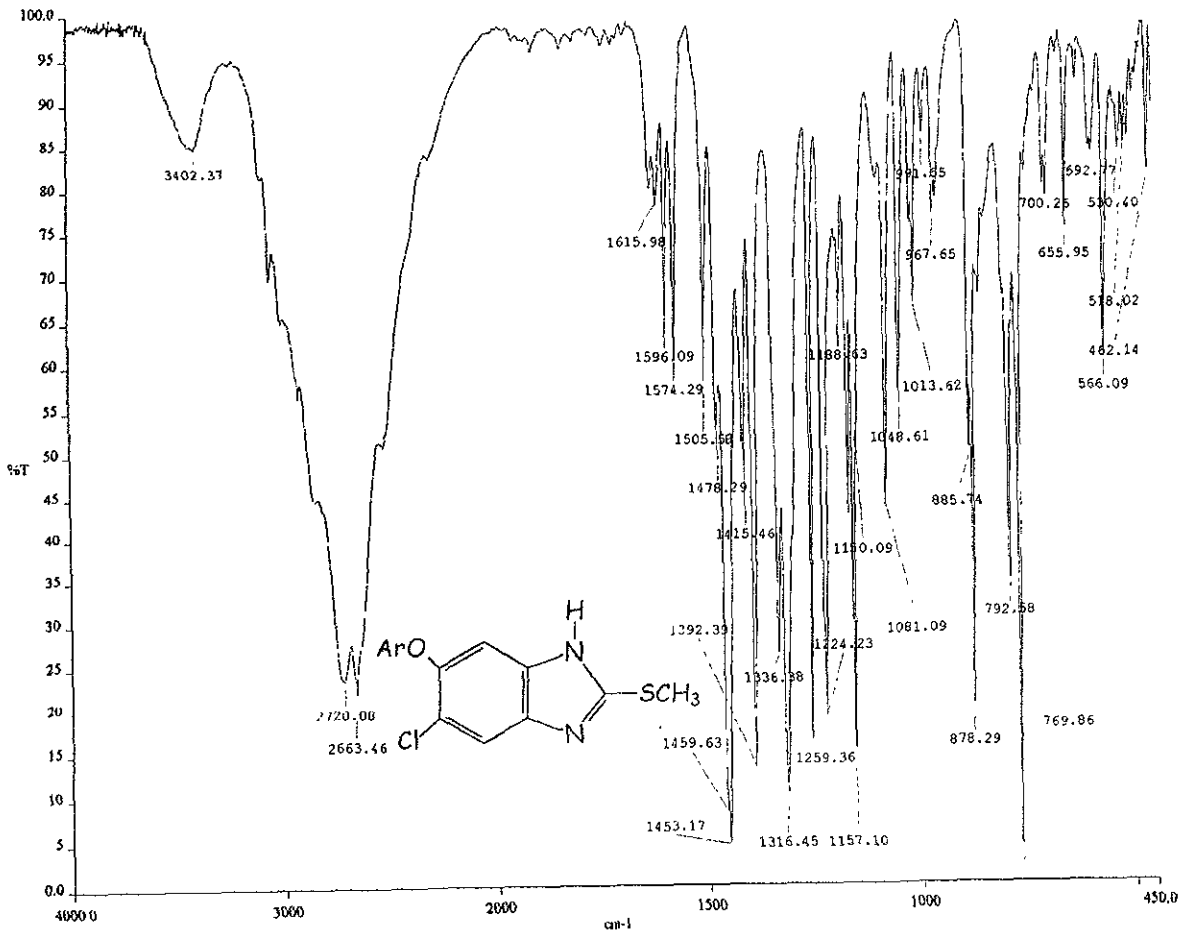
[ Mass Spectrum ]  
RT : 2.95 min  
Ion Mode : EI+

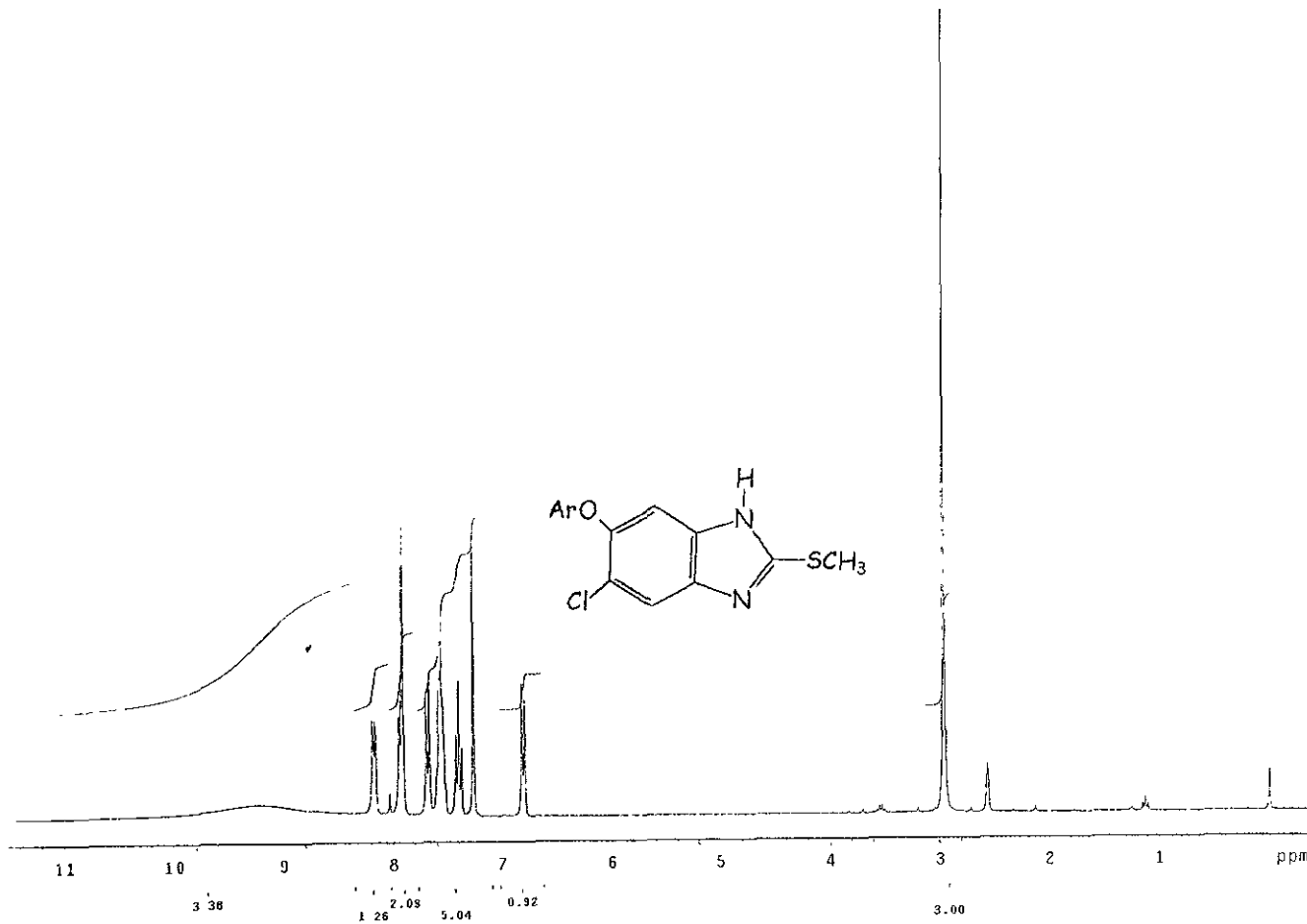
Scan# : (95,101)-(20,69)-(154... Temp : 173.0 deg.C  
Int. : 42.32



87

ESPECTRO NO. 9: 5-Cloro-2-mercapto-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (7).





89

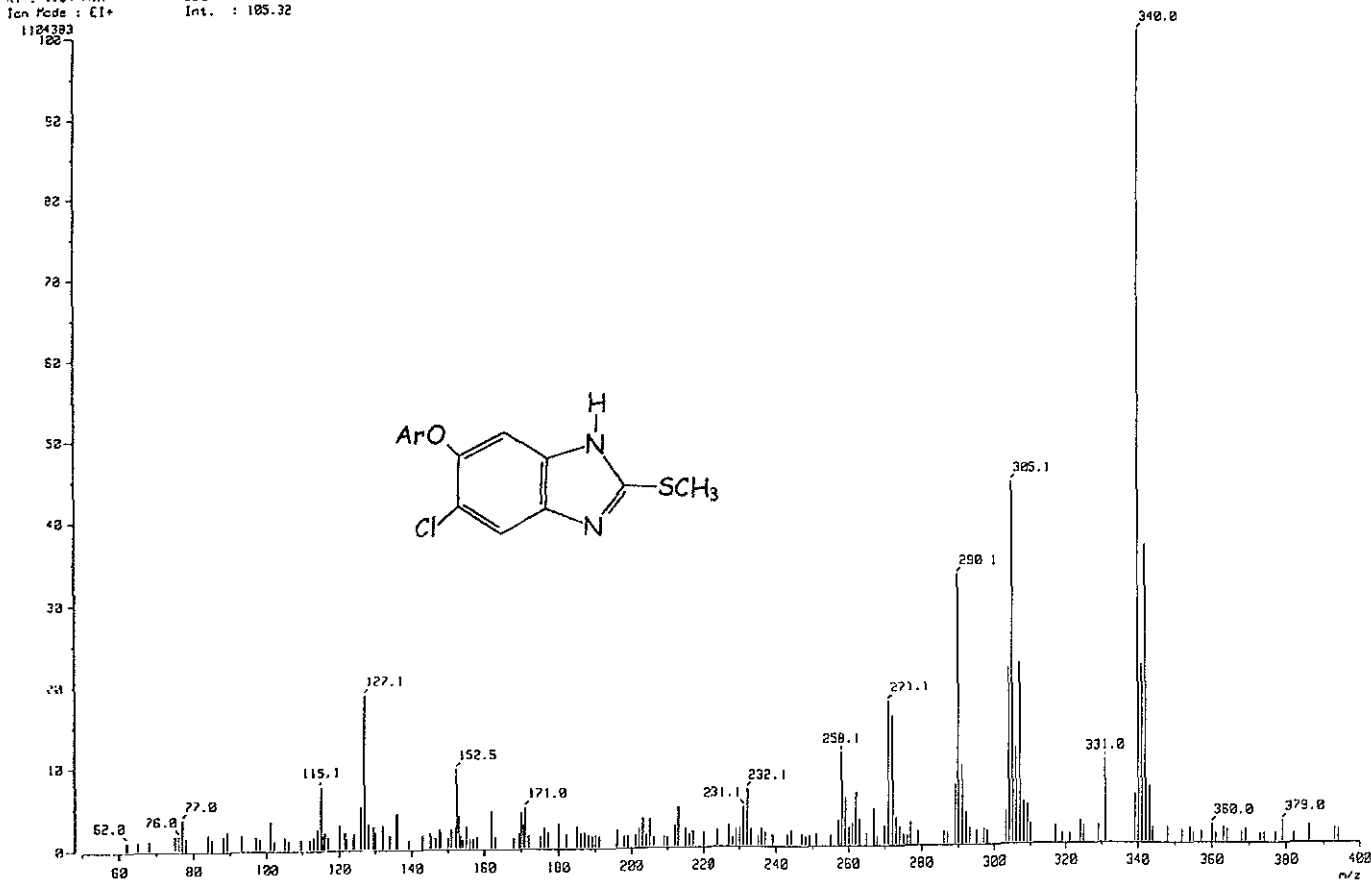
ESPECTRO NO. 11 (DMSO/CDCl<sub>3</sub>): 5-Cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-benzimidazol (8).

[ Mass Spectrum ]  
RT : 1.54 min  
Ion Mode : EI+

Scan# : 22  
Int. : 105.32

Temp : 149.0 deg.C

90



ESPECTRO NO. 12: 5-Cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol (8).

## 10 BIBLIOGRAFIA

1. Quiroz, R. H. *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*, Limusa: México, 1989; 232.
2. Velasco, C. O.; Aguirre A. M. T. *Enfermedades parasitarias: Fasciolosis*. 365-371.
3. Trejo, C. L., Giles, H. I.; Casildo, N. J.; Mariaca, E. A. "Las fasciolosis y su hospedero intermediario en México"; Seminario Internacional de Parasitología Animal: Cuernavaca, Mor, 1986; pp 127-135.
4. Atias, A. "Fasciolosis"; en *Parasitología clínica*, Pub. Téc. Mediterráneo: Chile, 1991; 334-340.
5. Vertiz, S. G. *Evaluación Farmacocinética de  $\alpha$ -BIOF10 en ganado vacuno*; Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, 2000; 39-72.
6. Ibarra, F.; García, E.; Fernández, M.; Vera, Y.; Castillo, R.; Hernández, A. Eficacia fasciolicida de dos compuestos de síntesis química *in vitro* e *in vivo* en ovinos. *Vet. Mex.* 1997, 28(4), 291-296.
7. Ibarra, F.; Vera, Y.; Hernández, A.; Castillo, R. Eficacia fasciolicida del compuesto alfa contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Vet. Mex.* 1997, 28(4): 297-301.
8. Del Rivero, L. M. *Farmacocinética del  $\alpha$ BIOF10 en borregos*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, 1998; 31-69.
9. Mascoma *et al.* "Estudio Multidisciplinario Integrado de la Fasciolosis Humana en el Altiplano Norte Boliviano"; Dirigido por el INLASA y apoyo de la OPS/OMS, 1997.
10. Wolff, K.; Eckert, J.; Schneiter, G.; Lutz, H. Efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* in sheep and goats. *Vet. Parasitol.* 1983, 13, 145-150.
11. Craig, T. M.; Huey, R. L. Efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* and *fascioloides magma* in naturally infected calves. *Am. J. Vet. Res.* 1984, 45(8), 1644-1645.
12. Eckert, J.; Schneiter, G.; Wolff, K. FASINEX® (triclabendazole)-a new fasciolicide *Berl. Munich. Eierarztl. Wschr.* 1984, 91, 349-356.

13. Robinson, C. P. Triclabendazole. *Drugs of today*. 1985, 21(5), 227-233.
14. Amman, A. H.; Shargel, L. Drug Product Development in Pharmaceutical Industry. In *Comprehensive Pharmacy Review*; Shargel, L., Ed.; Williams & Wilkins: USA, 1997; 1-7, 93-95.
15. Patel, N. K.; Kennon, L.; Levinson, R. S. Pharmaceutical Suspensions. In *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, Lachman, L., Ed.; Limusa: USA, 1984; 479-501.
16. Ofner III, C. M.; Schnaare, R. L.; Schwatz, J. B. Oral Aqueous Suspensions. In *Pharmaceutical Dosage Forms*, Lieberman, H. A.; Rieger, M. M; Banker, G. S., Ed.; Marcel Dekker: USA, 1989; 231-263.
17. Fairweather, J.; Boray J. C. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. *The Vet. J.* 1999, 158(2), 81-112.
18. Tabibi, S. E.; Rhodes, C. T. Disperse Systems. In *Modern Pharmaceutics*; Banker, S. B., Ed.; Marcel Dekker: USA, 1995; 299-319.
19. Martin, A.; Bustamante, P.; Chun, A. H. C. *Physical Pharmacy*, LEA & FEBIGER: USA, 1993; 477-486.
20. Ibarra, V. F.; Montenegro, N. C.; Flores, C. J.; Hernández, C. A.; Castillo, B. R. Evaluación de cuatro vehículos para formular un fasciolicida experimental. *Vet. Mex.* 1999, 31(1), 47-51.
21. *Anthelmintics 164012<sup>a</sup>*, *Chem. Abstr.* 1983, 99, pp 334.
22. Beilstein, *Organische Chemie, Band XII*, 626, 733-734.
23. Aldrich, *Manual de Productos Químicos Finos y Equipo de Laboratorio 2000-2001*; Aldrich: México, 2000; Compuesto D6, 800-2, 554.
24. Remington, J., *et al. Farmacia de Remington*; Médica Panamericana. Argentina: 1998. Tomo 2, 2323-2326.
25. Loyd, V. A. *The art, science, and technology of pharmaceutical compounding*. American Pharmaceutical Association: USA, 1998; 167-170.
26. Därr, A. *Tecnología Farmacéutica*; Acriba: España, 1981; 125-130.

27. Iddon, B.; Kutschy, P.; Robinson, G. A.; Suschitzky, H.; Kramer, W.; Neugebauer, F. A. *2H-Benzimidazoles (Isobenzimidazoles). Part 7. A New Route to Triclabendazole [5-Chloro-6-(2,3-dochlorophenoxy)-2-methylthio-1H-benzimidazole] and Congeneric benzimidazoles.* *J Chem. Soc. Perkin Trans 1.* **1992**, 3129-3134.
28. *Dictionary of Drugs*; Elks, J., Ed.; Chapman and Hall: USA, 1990; 23, 159, 183, 216, 374, 755, 864, 923, 1063, 1234.
29. Boray, J. C.; Crowfoot, P. D.; Strong, M. B.; Allison, J. R.; Schellenbaum, M.; Orelli, Von M.; Sarasin, G. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *Veterinary Record.* **1983**, 113, 315-317.
30. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*; Wade, A. and Weller, J. P., Ed.; American Pharmaceutical Association: Washington, 1994; 71-77, 94, 247-249, 310-313, 355-361, 411-414, 418-419, 424-427.
31. Rodríguez, M. S. *Síntesis de Derivados Naftalénicos 1-metilderivados del Triclabendazol con Actividad Antihelmíntica Potencial*; Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, **1995**; 11-37.
32. Gaasenbeek, C.P.H.; Moll, L.; Cornelissen, J.B.W.J.; Vellema, P.; Borgsteede, F.H.M. An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology.* **2000**, 95, 37-43.
33. Lammert, M.; Gaasenbeek, C.P.H.; Vellema, P.; Borgsteede, F.H.M. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Veterinary Parasitology.* **2000**, 91, 153-158.
34. United States Pharmacopea. USP 24; 53, 1020.
35. Gorman, T.; Aballay, J.; Fredes, F.; Silva, M.; Agullon, J.C.; Alcáino, A.H. Immunodiagnosis of Fasciolosis in Horses and Pigs Using Western Blots. *International Journal for Parasitology.* **1997**, 27(11), 1429-1432.