



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**ESTUDIOS BIOFARMACEÚTICOS DEL α -BIOF10,
UN NUEVO AGENTE FASCIOLICIDA**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

LIC. EN FARMACIA NILS ANTONIO RAMÍREZ ARGUEDAS



TUTOR: DRA. HELGI HELEN FRANCISCA JUNG COOK

AÑO: 2007



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

Dra. Luz Elena Vera Ávila

Vocal

Dra. María Estela Meléndez Camargo

Secretario

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

Primer suplente

Dr. Froylán Ibarra Velarde

Segundo suplente

Dr. Francisco Hernández Luis

Agradecimientos

Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México.

A la Universidad de Costa Rica y la Facultad de Farmacia por su apoyo complementario para la realización y conclusión de mis estudios en la Universidad Nacional Autónoma de México.

La investigación para la realización de esta tesis fue llevada a cabo en la Facultad de Química, Lab. 112, Conjunto E y en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Producción e Investigación en Producción y Salud Animal (CEPIPSA) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la doctora Helgi Jung por su paciencia y dedicación, no sólo en lo personal sino en lo académico, además por su guía como investigadora.

A la Maestra en Ciencias Lourdes Mayet por su asesoría y colaboración.

Al veterinario Dr. Froylán Ibarra Velarde por su cooperación en la parte experimental.

Agradecimiento a todos los miembros del jurado por sus valiosos comentarios y correcciones del proyecto presentado.

Dedicatoria

A MIS PADRES Y MIS HERMANOS,

por su apoyo y cariño incondicional.

Índice

Página

Resumen	1
Introducción	2
1. Generalidades	3
1.1 Fasciola hepática v Fasciolosis. Definición v generalidades.....	3
1.1.1 Fasciolosis	3
1.1.2 Fasciola hepática v ciclo de evolutivo	3
1.1.3 Importancia e impacto de la fasciolosis	7
1.2 Control de la enfermedad, farmacoterapia v nuevas tendencias	8
1.2.1 Farmacoterapia contra fasciola hepática	8
1.2.2 Triclabendazol.....	10
1.3 El alfa (5-cloro-2-metil-6-(1-naftiloxi)-1 <i>H</i> -bencimidazol): nuevo agente fasciolicida.....	14
2. Parte Experimental	18
2.1 Método analítico para la cuantificación del compuesto alfa v sus metabolitos sulfóxido v sulfona en plasma	18
2.1.1 Reactivos v equipo.....	18
2.1.2 Preparación de soluciones.....	19
2.1.3 Curva de Calibración	19
2.1.4 Procedimiento de extracción.....	21
2.1.5 Condiciones Cromatoográficas.....	23
2.2 Validación del método analítico	23
2.2.1 Selectividad.....	24
2.2.2 Linealidad.....	24
2.2.3 Recobro absoluto.....	25
2.2.4 Precisión del método	25
2.2.5 Exactitud	25
2.2.6 Límite de cuantificación	26
2.2.7 Estabilidad de muestra procesada.....	26
2.3 Método de análisis para la cuantificación del sulfóxido del alfa en solución amortiguadora pH 7.4	27
2.3.1 Preparación de soluciones.....	27
2.3.2 Curva de calibración	27
2.4 Estudio Farmacocinético en borreos.....	28
2.4.1 Reactivos, materiales v equipo	28
2.4.2 Formulación administrada.....	28
2.4.3 Farmacocinética en borreos.....	28
2.5 Unión a proteínas del sulfóxido del compuesto alfa.....	29
2.5.1 Reactivo, materiales v equipo.....	29
2.5.2 Tiempo de equilibrio.....	30
2.5.3 Unión del sulfóxido del compuesto alfa a proteínas plasmáticas totales	31
2.5.4 Análisis de los datos	31
3. Resultados v Análisis	32
3.1 Método analítico para la cuantificación del alfa v sus metabolitos sulfóxido v sulfona en plasma.....	32
3.1.1 Condiciones cromatoográficas.....	32
3.2 Validación del método analítico	34
3.2.1 Selectividad.....	34
3.2.2 Linealidad.....	34
3.2.3 Recobro absoluto.....	38
3.2.4 Precisión del método	39

3.2.5	Exactitud	42
3.2.6	Límite de cuantificación	43
3.2.7	Estabilidad de muestra procesada	44
3.3	Estudio farmacocinético en borraeos	45
3.3.1	Análisis farmacocinético del sulfóxido del alfa	45
3.3.2	Análisis farmacocinético de la sulfona	49
3.4	Unión a proteínas del sulfóxido del alfa	50
3.4.1	Determinación del sulfóxido del alfa en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4	50
3.4.2	Determinación del tiempo de equilibrio	51
4.	Conclusiones	53
5.	Bibliografía	54
6.	Apéndice	59
6.1	Apéndice A. Concentraciones plasmáticas en $\mu\text{g/mL}$ del sulfóxido del alfa a los diferentes tiempos de muestreo encontrados en borraeos <i>Pelibuev</i> (n=8)	59
6.2	Apéndice B. Concentraciones plasmáticas en $\mu\text{g/mL}$ de la sulfona del alfa a los diferentes tiempos de muestreo encontrados en borraeos <i>Pelibuev</i> (n=8)	60
6.3	Apéndice C. Perfiles farmacocinéticos del sulfóxido v la sulfona después de la administración de una dosis de 12 mg/ka del compuesto alfa en plasma de borraeos <i>Pelibuev</i> (n=8)	61
6.4	Apéndice D. Parámetros farmacocinéticos del sulfóxido después de la administración de una suspensión del alfa a una dosis de 12 mg/Ka a 8 borraeos <i>Pelibuev</i>	65
6.5	Apéndice E. Parámetros farmacocinéticos de la sulfona después de la administración de una suspensión del alfa a una dosis de 12 mg/Ka a 8 borraeos <i>Pelibuev</i>	66
6.6	Apéndice F. Cromatograma ampliado del blanco de plasma	67

Índice de Tablas

Tabla I. Eficacia de medicamentos antihelmínticos medida después de la inoculación de 500 metacercarias de <i>Fasciola hepática</i> en ganado vacuno.....	9
Tabla II. Evaluación de cuatro vehículos para mejorar la eficacia del alfa contra fasciola en ovinos.....	16
Tabla III. Preparación de la curva para el sulfóxido del alfa en solución amortiguadora de fosfatos 0.067 M pH 7.4.....	27
Tabla IV. Pesos de los borreos utilizados para el estudio farmacocinético del alfa v las dosis (mg) administradas en una suspensión al 10 % de alfa.....	29
Tabla V. Suma de cuadrados residuales para cada uno de los modelos.....	34
Tabla VI. Evaluación de la exactitud de las curvas de calibración para el fármaco alfa.....	36
Tabla VII. Evaluación de la exactitud de las curvas de calibración para el sulfóxido del alfa.....	37
Tabla VIII. Evaluación de la exactitud de las curvas de calibración para la sulfona del alfa.....	37
Tabla IX. Evaluación de la linealidad para el alfa v sus metabolitos.....	37
Tabla X. Recobro absoluto para el alfa.....	38
Tabla XI. Recobro absoluto para el sulfóxido del alfa.....	38
Tabla XII. Recobro absoluto para la sulfona del alfa.....	39
Tabla XIII. Repetibilidad del compuesto alfa en plasma.....	39
Tabla XIV. Repetibilidad del sulfóxido del alfa en plasma.....	40
Tabla XV. Repetibilidad de la sulfona del alfa en plasma.....	40
Tabla XVI. Reproducibilidad durante tres días para el alfa.....	41
Tabla XVII. Reproducibilidad durante tres días para el sulfóxido del alfa.....	41
Tabla XVIII. Reproducibilidad durante tres días para la sulfona del alfa.....	42
Tabla XIX. Exactitud del método analítico para la cuantificación del alfa.....	42
Tabla XX. Exactitud del método analítico para la cuantificación del sulfóxido del alfa.....	43
Tabla XXI. Exactitud del método analítico para la cuantificación de la sulfona del alfa.....	43
Tabla XXII. Relación señal ruido para el alfa v sus metabolitos.....	44
Tabla XXIII. Estabilidad de muestra procesada para el alfa v sus metabolitos.....	44
Tabla XXIV. Valores promedio de la concentración plasmática del sulfóxido v la sulfona del alfa después de la administración de una dosis de 12 mg/Kg de alfa en 8 borreos.....	46
Tabla XXV. Promedio de los parámetros farmacocinéticos del sulfóxido del alfa obtenidos después de la administración oral de 12 mg/Kg del alfa a 8 borreos. por el método modelo independiente.....	47
Tabla XXVI. Promedio de los parámetros farmacocinéticos de la sulfona del alfa obtenidos después de la administración oral de 12 mg/Kg del alfa a 8 borreos.....	48
Tabla XXVII. Curvas de calibración del sulfóxido del alfa en amortiguador de fosfatos. 0.067M. pH 7.4.....	50
Tabla XXVIII. Grado de unión a proteínas totales del sulfóxido del alfa para establecer el tiempo de equilibrio.....	52

Índice de Figuras

Figura 1. Aspectos de fasciola hepática.A. Estructura v forma de la fasciola hepática. B. Caracol del género <i>Limnaea</i> . C. Ciclo evolutivo de la fasciola.....	4
Figura 2. Estructura del triclabendazol.....	10
Figura 3. Compuestos derivados del triclabendazol.....	15
Figura 4. Esquema de la preparación de la curva de calibración del alfa v sus metabolitos.....	20
Figura 5. Esquema del procedimiento de extracción empleado para el alfa v sus metabolitos.....	22
Figura 6. Cromatograma de una mezcla del alfa v sus metabolitos. v el estándar interno (sulfóxido de albendazol) en plasma. Condiciones cromatográficas: columna μ -Bondapak. 10 μ . 300x3.9 mm. flujo 1.0mL/min. 304 nm. fase móvil metanol:acetonitrilo:agua (40:30:30).1. Señal del sulfóxido del albendazol. 2. Señal de la sulfona del compuesto alfa. 3. Señal del sulfóxido del alfa. 4. Señal del compuesto alfa.....	32
Figura 7. Cromatogramas del alfa v sus metabolitos: v del estándar interno (sulfóxido de albendazol) en plasma. Condiciones cromatográficas: columna μ -Bondapak. 10 μ . 300x3.9 mm. flujo 1.0mL/min. 304 nm. fase móvil metanol:acetonitrilo:amortiguador de acetato 10 mM. pH 5 (40:30:30). Ver en Apéndice F ampliación del cromatograma del blanco de plasma.....	33
Figura 8. Análisis de linealidad con el modelo de mejor ajuste para cada uno de los analitos en plasma. Panel A. Linealidad para el alfa. Panel B. Linealidad para el α -SO. Panel C. Linealidad para el α -SO ₂	35
Figura 9. Valores promedio (\pm DSTD) de la concentración plasmática del sulfóxido v la sulfona del alfa después de la administración de una dosis de 12 mg/Kg de alfa en 8 borreños. (DSTD= desviación estándar).....	46
Figura 10. Curva de calibración promedio del sulfóxido del alfa en amortiguador de fosfatos. 0.067M. pH 7.4. v= áreas. x= concentración. μ g/mL.....	51

Resumen

En el presente trabajo se determinó la farmacocinética del compuesto alfa, un nuevo agente fasciolicida. El estudio se llevó a cabo en borregos *Pelibuey* a los cuales se les administró una dosis de 12 mg/Kg en forma de suspensión.

Los resultados mostraron que el compuesto alfa se metaboliza extensamente por lo que solo pudo cuantificarse el sulfóxido y la sulfona. La farmacocinética de ambos metabolitos se evaluó por un modelo no compartimental (MNC).

Los parámetros farmacocinéticos del sulfóxido y la sulfona fueron los siguientes: el t_{max} (tiempo máximo) del sulfóxido se presenta a las 14 (8 a 24) horas, mientras que el de la sulfona a las 23 (12 a 30) horas. A este t_{max} la concentración máxima (C_{max}) encontrada para ambos, respectivamente, es de 5.0 (4.3 a 8.3) y 2.3 (1.4 a 4.1) $\mu\text{g/mL}$. El tiempo medio de residencia (MRT^{inf}_0) fue de 36 (34 a 40) horas para el sulfóxido y para la sulfona de 39 (34 a 48) horas. El tiempo de vida media ($t_{1/2}$) para ambos metabolitos es muy similar siendo de 20 (19 a 21) horas y de 19 (16 a 24) horas, respectivamente. Esto sugiere que la permanencia de los metabolitos es alta al observar el tiempo de vida media, el t_{max} y el tiempo medio de residencia. Como el sulfóxido es el que provee la mayor actividad su permanencia en el organismo del animal es importante, como se ve reflejado en el t_{max} , MRT^{inf}_0 y en $t_{1/2}$.

Al llevar a cabo el estudio de unión a proteínas totales plasmáticas del sulfóxido del alfa, se encontró entre 86 y 83 %, lo que sugiere un fármaco altamente unido, lo que establece relación con el $t_{1/2}$, t_{max} y el MRT^{inf}_0 . La información obtenida apoyará al diseño del régimen de dosificación de este compuesto para los estudios posteriores de eficacia.

Introducción

En la *XII Reunión Interamericana a Nivel Ministerial en Salud y Agricultura* realizada en Brasil en el año 2001, la Organización Mundial de la Salud y la Organización Panamericana de la Salud dirigen su mirada a una zoonosis que está cobrando interés médico, ésta es la fasciolosis, enfermedad originada por la *Fasciola hepática*.

Este parásito infecta a rumiantes y principalmente a ovinos, especie que ha resultado ser altamente susceptible. Las implicaciones en los hatos ovinos por la infección con fasciola son: la alteración del estado de salud del animal lo que provoca la reducción en la tasa de embarazos y partos, la lentitud en llegar al estado de pubertad del animal, la reducción en el número de nacimientos y baja en la tasa de nacimientos múltiples lo cual es secuela del bajo suministro de minerales y proteínas a la médula ósea, y un extenso daño hepático provocado por fasciolosis crónica.

México por ser un país productor y consumidor de ovinos, no escapa al problema de la fasciolosis. A la fecha, el único fármaco en el mercado que actúa sobre todos los estadios de fasciola es el triclabendazol, el cual es un producto de importación, lo que aumenta el costo del tratamiento. En la búsqueda de nuevos fasciolicidas, el departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM se evaluó una serie de derivados bencimidazólicos entre ellos el compuesto alfa, el cual ha demostrado actividad fasciolicida comparable a la del triclabendazol (Fasinex).

Estudios realizados en ovinos con el compuesto alfa han demostrado una eficacia del 100 % en todos los estadios de fasciola, además de una buena tolerancia a dosis de 10 y 15 mg/Kg. Con base en lo anteriormente descrito, se llevó a cabo el presente trabajo con los siguientes objetivos:

- Caracterizar la farmacocinética del compuesto alfa en borregos
- Determinar el grado de unión del sulfóxido del compuesto alfa a proteínas totales

1. Generalidades

1.1 Fasciola hepática y Fasciolosis. Definición y generalidades

1.1.1 Fasciolosis

La fasciolosis es una zoonosis parasitaria que es producida por un tremátodo que lleva por nombre *Fasciola hepática* (distoma del hígado). En su ciclo intervienen hospederos definitivos como lo son los animales herbívoros y también se puede encontrar en el hombre. Como hospedero intermediario se encuentra un pequeño caracol de agua dulce del género *Limnaea*.^{1,2} La fasciola es vulgarmente conocida como “pirihuin” en Chile, o “saguipé” en el sur de Argentina³ y “orejuela” o “palomilla” en México.

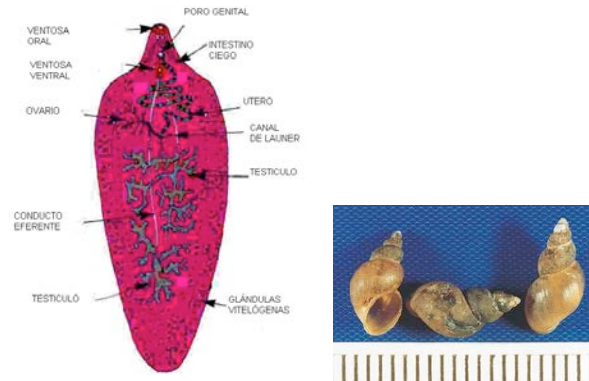
Esta enfermedad es común en ovejas y en ganado vacuno^{4,5}, aunque también puede infectar cabras, conejos, cerdos, equinos, ratas y varios mamíferos silvestres⁶ (por ejemplo búfalos, ciervos y gamos) y como ya se mencionó al hombre.^{7,3}

El tremátodo de la fasciola se aloja en el parénquima hepático¹, conductos biliares y vesícula biliar³ lo que provoca grandes pérdidas en su producción en la tasa de concepción y preñez de las hembras, se reduce el número de corderos, nacimientos de animales con bajo peso, baja mineralización en huesos, retardo en el comienzo de la pubertad, disminución de peso, así como el daño extenso en el hígado que es característico de una fasciolosis hepática⁹.

1.1.2 Fasciola hepática y ciclo de evolutivo

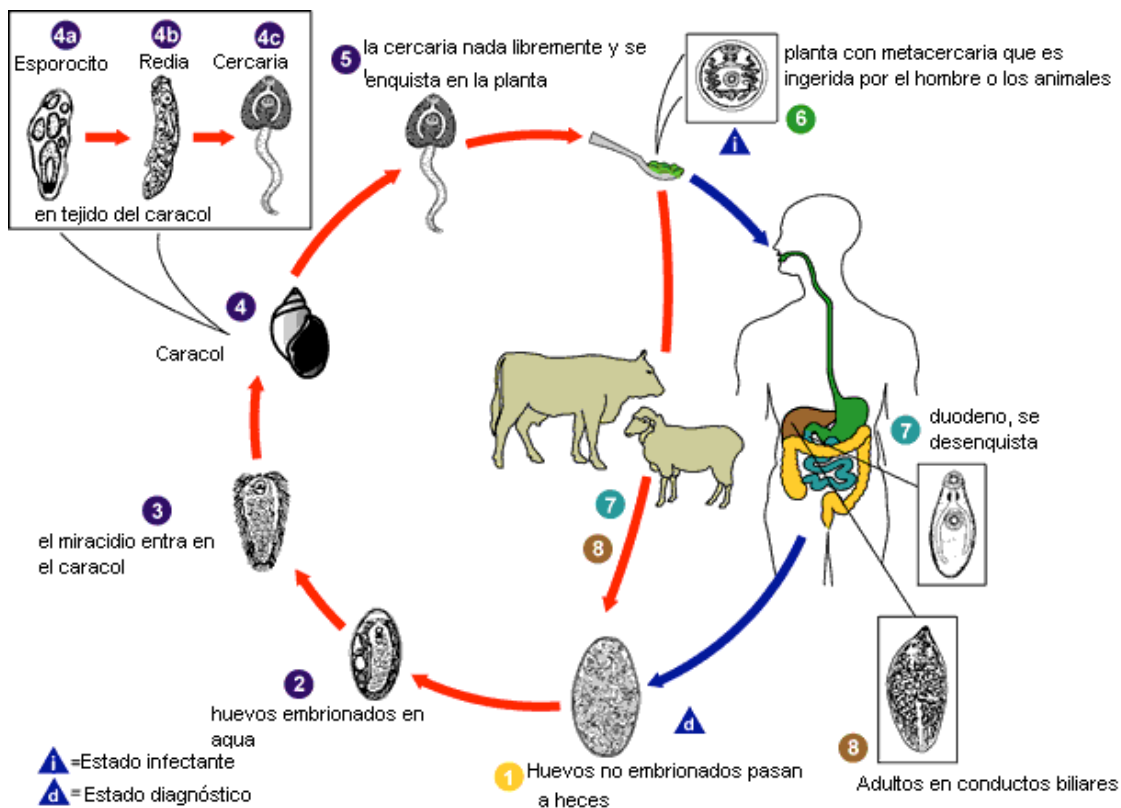
La fasciola es un tremátodo digenético (Figura 1), con el aspecto de una hoja lanceolada, con un cono cefálico diferenciado.¹⁰ Mide de 2 a 3 cm de longitud y de 1 a 1.5 cm de ancho y es de color café blanquecino; su tegumento está constituido por una capa citoplasmática continua, sin límites celulares, y cuyos núcleos se encuentran por debajo de la capa muscular superficial.³

Posee dos ventosas musculares, una anterior peribucal y otra ventral o acetábulo. Es un organismo hermafrodita y sus órganos sexuales están en la porción central del parásito. Presenta un intestino muy ramificado que termina en dos ciegos.



A.

B.



C.

Figura 1. Aspectos de fasciola hepática. **A.** Estructura y forma de la fasciola hepática. **B.** Caracol del género *Limnaea*. **C.** Ciclo evolutivo de la fasciola.

En el ciclo evolutivo del parásito que se presenta en la Figura 1, los huevos que son encontrados en las heces del hospedero (1) pueden sobrevivir hasta un año.^{1,2,3} Si los huevos entran en contacto con el agua de vertientes o de acequias que contengan escasas sustancias orgánicas en descomposición esto provoca que los huevos maduren (2). La maduración se ve favorecida a temperaturas que oscilan entre 10 y 30 °C. Así en un plazo de dos a tres semanas, los huevos dan origen a un primer estado larval, el *miracidio* (3), de aspecto ovalado y recubierto de cilios, que puede retardar su aparición en las bajas temperaturas del invierno.¹ Este miracidio nada libremente estimulado por la luz y en un plazo no mayor de veinticuatro horas debe encontrar a su hospedero, el caracol de género *Limnaea* (4) y (Figura 1B) cuyo tamaño es de 5 a 10 mm de longitud (en Europa, *L. truncatula*; en Argentina y Chile *L. viatrix* o *Galba* (*P. viatrix*)). El miracidio es atraído por algunas sustancias expelidas por el caracol, el cual penetra al molusco, perdiendo sus cilios (4a, 4b y 4c). Dentro del caracol se forma el *esporoquiste*, elemento alargado como una bolsa, en cuyo interior, y a partir de brotes germinales se forman dos generaciones de redias y, luego, las *cercarias* (5) (formas redondeadas con cola larga y fina). Por cada miracidio que penetra en el caracol, se producen entre quinientas y seiscientas cercarias. Éstas últimas son activas y abandonan al caracol dirigiéndose hacia las hierbas que crecen en el agua para adherirse a sus hojas (6); luego pierden la cola y se enquistan. La cercaria enquistada o metacercaria mide alrededor de 500 µm, por lo cual es difícil verla a simple vista. Posee una gran vitalidad y constituye la forma infectante para los hospederos definitivos. La metacercaria contenida en el pasto o en algunas verduras, especialmente los berros (*Nasturtium officinale*) al ser ingerida por los animales o por el hombre, continúa su desarrollo en el tubo digestivo en donde se disuelve su envoltura y queda libre la forma juvenil (7). Este distoma joven atraviesa la pared intestinal y, tres horas después, se encuentra en la cavidad peritoneal. Permanece allí de tres a quince días, avanzando por el peritoneo hasta llegar a la cápsula de Glisson, a la que perfora para penetrar en el hígado. Migra a través del parénquima hepático y se localiza en los conductos biliares, donde alcanza el estado adulto unos meses después de la infección. Se ha reportado que cuando llega a los conductos biliares la fasciola adulta puede vivir por varios años¹. Una vez que los huevos son producidos por la fasciola estos son llevados

por la bilis al intestino y, desde allí al exterior por las heces del hospedero, para nuevamente iniciar el ciclo.

La presencia de este parásito a nivel hepático y así como en las diferentes estructuras mencionadas da como consecuencia inflamación peritoneal, edema de epiplón mayor y adherencias laxas al diafragma y a los órganos vecinos. La cápsula de Glisson presenta engrosamiento e infiltración leucocitaria, especialmente eosinófilos. El hígado aumenta su tamaño, con formaciones denominadas “microabscesos” de color blanquecino y de aproximadamente 2 mm. Se presentan focos necróticos que se originan en el periodo de invasión por parte del parásito, además con la presencia de zonas de esclerosis. Por esto los conductos biliares interlobulares que están alrededor de estos focos aparecen dilatados y esclerosados.

La hiperplasia de los conductos biliares no sólo es provocada por el contacto físico del parásito sino también por medio de inducción química. Una es debida a la secreción de prolina, un aminoácido que interviene en la síntesis de colágeno en el parásito. La otra es que durante la migración del parásito en el huésped se va secretando cisteín-proteasas¹¹ que favorecen también al daño a nivel del tejido hepático.

Aunado a lo anteriormente descrito, pueden presentarse complicaciones a nivel de vesícula biliar, el colédoco o la ampolla de Vater, lo cual puede obligar a intervenciones quirúrgicas de urgencia.

Además de los problemas mencionados a nivel peritoneal y hepático, se pueden presentar distomatosis erráticas, y se han llegado a encontrar a nivel de pulmones, piel y raramente en ojos.^{12,13}

Se ha encontrado que en la oveja, la rata y el conejo, la reacción tisular, aunque sea severa, no logra aislar a los parásitos y éstos pueden completar con facilidad su ciclo de desarrollo, siendo especies susceptibles al parásito; en el vacuno y en el hombre, la reacción fibrótica logra aislar y matar distomas jóvenes en la etapa de invasión

(invasión y migración de fasciolas jóvenes al parénquima hepático) y a los adultos localizados en las vías biliares; en el hámster, el cerdo y los carnívoros, esta reacción es aún más eficiente porque detiene, aísla y mata tanto los helmintos jóvenes que migran, como a los adultos. La inmunidad adquirida es tipo humoral (con anticuerpos precipitantes, aglutinantes y fijadores del complemento) y de tipo celular.

1.1.3 Importancia e impacto de la fasciolosis

En la década de los noventa, la fasciolosis empieza a ser considerada por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) por su importancia en salud animal y humana. Los brotes que se registraban eran localizados y afectaban un número reducido de personas. Es así a principios del siglo XXI la OMS empieza a reconocer el interés médico a escala mundial en este tipo de zoonosis.⁷

En Latinoamérica, los casos de fasciolosis más numerosos tanto en humanos como en animales provienen de Chile, Cuba, Perú y Argentina, Bolivia y Puerto Rico. En Europa, se han encontrado en los países del Mediterráneo, especialmente en Francia y en zonas norafricanas como Argelia y Egipto. También Irak y Turquía son algunos que se van sumando a la lista de países con este gran problema emergente.

La fasciolosis, no sólo se ha convertido en un problema en la salud y productividad animal, sino también en la aparición de nuevos casos en humanos^{14,15}, como por ejemplo en Egipto se reporta que alrededor de un 23 % de una población de niños y niñas alrededor del Delta del Nilo se han encontrado infectados por el tremátodo con diferentes grados de evolución de la enfermedad.¹⁶

La consecuencia de la expansión de la fasciola hepática se debe a los cambios climáticos que favorecen la infectación del caracol *Limnaea*, la capacidad que tiene la *F. hepática* para colonizar y adaptarse a nuevos huéspedes y al ambiente. También a la inmigración de personas y animales, así como la falta de educación sanitaria en manejo de alimentos.^{17, 18}

1.2 Control de la enfermedad, farmacoterapia y nuevas tendencias

La fasciolosis puede ser controlada y eliminada por la administración de fármacos antiparasitarios (fasciolicidas) para tratamiento del huésped, por la eliminación del huésped intermediario mediante el uso de molusquicidas y la aplicación de medidas sanitarias.

Es importante señalar que los antiparasitarios deben ser sustancias con baja o ninguna toxicidad en los pacientes enfermos. Es así mismo que los usos terapéuticos de los antiparasitarios son complejos y sometidos a variaciones originadas por factores en el huésped, del parásito y del ambiente.

Los molusquicidas en su mayoría son tóxicos, por ejemplo el sulfato de cobre y el N-tritilmorfolina. Estos productos son aplicados sobre el forraje a mitad del verano o a mitad de la primavera, también en otoño sin perder su eficacia. El inconveniente de los agentes molusquicidas es que los forrajes que son aplicados con ellos no pueden ser consumidos inmediatamente por los animales, por eso deben ser los rebaños trasladados a otras pasturas.

La aplicación de medidas de salud pública deben estar dirigidas a disminuir la reinfección y el contacto con el agente patógeno, el uso de quimioterapia contra fasciola y la disminución o eliminación de hospederos intermediarios (caracol *Limnaea*), lo anterior permite tener resultados para la erradicación del parásito.

1.2.1 Farmacoterapia contra fasciola hepática

Los agentes antiparasitarios, deben ser activos contra todas las fases de desarrollo de los parásitos infectantes, estables en diversas situaciones de empleo; no tener acción como inductor de resistencia a fármacos y ser lo suficientemente baratos. En la actualidad son pocos los antiparasitarios que cumplen con estos criterios.

Entre los agentes con acción fasciolicida se encuentran: rafoxanida, oxiclozanida, clorsulon, nitroxinil, albendazol y triclabendazol. En la Tabla I se presenta las características de cada uno en eficacia y acción sobre fasciola.^{19,20,21}

Tabla I. Eficacia de medicamentos antihelmínticos medida después de la inoculación de 500 metacercarias de *Fasciola hepática* en ganado vacuno

Medicamento	Dosis	Eficacia
Triclabendazol	12 mg/Kg	80.6 a 100 % en todo el espectro de estadios de <i>F. hepática</i> , a las 1,2,4,6,8,10 y 12 semanas
	5 mg/Kg y 6 mg/Kg	más del 99 % efectiva contra edades de <i>F. hepática</i> de 10 a 12 semanas
Nitroxinil	10 mg/Kg	No eficaz contra estadios inmaduros de 2 semanas, eficacia de 19.3 a 45.4% en estadios de 6 semanas, efectivo contra las infecciones adultas de <i>F. hepática</i>
Rafoxinida	7.5 mg/Kg	ineficaz contra infecciones de dos semanas, contra infecciones de 6 semanas su eficacia 15.7% y contra infecciones de doce semanas la eficacia fue de 90.1 %
	10 mg/Kg	40.1 % eficaz en fasciola en estadios de 6 semanas
Clorsulon	7mg/Kg	16.7 % en estadios inmaduros y a un 99 % para estadios de 10 semanas
Albendazol	15 mg/Kg	ineficaz a las 6 semanas y 33.9 % eficaz contra estadios de dos semanas
Oxiclozanida	13 mg/Kg	no demostró actividad a la 6, 8 y 10 semanas, a las 12 semanas una efectividad 28.6 a 45.4 %
Clorsulon:	7 mg/Kg	en un rango de 16.7 % en inmaduras y en infección de 10 semanas de 99 %

1.2.2 Triclabendazol

El triclabendazol es un antihelmíntico bencimidazólico cuya estructura se presenta en la Figura 2.

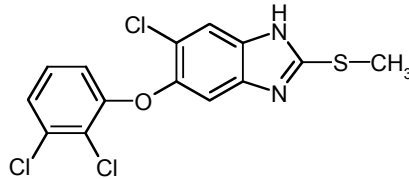


Figura 2. Estructura del triclabendazol

El triclabendazol ha sido utilizado por más de 20 años con muy alta eficacia contra estadíos juveniles y adultos de *Fasciola hepática*, siendo el fármaco de elección para el tratamiento de esta enfermedad en las siguientes especies animales: ovejas^{21,22,23,24,25}, cabras^{22,26}, ganado vacuno^{19,20,25}, búfalos^{27,28}, cerdos, caballos²⁹, ponis y asnos.³⁰ Es un fármaco que ha presentado seguridad y tolerabilidad en las especies tratadas.

Uso de triclabendazol en ovinos

En ovinos en dosis de 2.5 mg/Kg ha mostrado una eficacia de 90 a 98 % en formas infectantes de *Fasciola hepática* de 8 a 12 semanas. A dosis de 5 mg/Kg la eficacia fue de 92 a 98 % contra fasciola de 4 a 8 semanas y de 100 % para las de 12 semanas. A una dosis 10 mg/Kg, que es la dosis recomendada, se ha encontrado una eficacia del 99 a 100 % de 2 a 4 semanas. Se ha encontrado a esta última dosis que a una semana post infección muestra una eficacia del 95%.²⁵

El triclabendazol ha sido igual de eficaz al ser administrado no sólo por vía oral, sino por inyección intrarruminal o intra-abomasal. Se ha establecido que la tolerancia en ovinos es de 200 mg/Kg.²⁴

Metabolismo del triclabendazol

En todas las especies de mamíferos y también en rumiantes³¹, el triclabendazol (TCBZ) sufre un extenso metabolismo, por lo que en plasma sólo es posible cuantificar a sus metabolitos, el sulfóxido de triclabendazol (TCBZSO) y la sulfona (TCBZSO₂). lo cual indica que el TCBZ es removido de la sangre porta por el hígado seguido de su absorción.^{31,32} En ovinos además del sulfóxido y la sulfona del TCBZ, se han detectado hidroxiderivados del TCBZ en plasma.³³

En estudios *in vitro* con microsomas hepáticos, los sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo del TCBZ son principalmente el CYP-450 (citocromo P-450) y la flavin-mono-oxigenasa (FMO). De estos dos sistemas la FMO posee una mayor actividad (3.83 veces) para el proceso de sulfo-oxidación del TCBZ en comparación con el CYP-450. En cambio para la sulfonación (TCBZSO a TCBZSO₂) la participación de ambos sistemas es muy similar, con una relación de 1.31.

No sólo los procesos oxidativos dan lugar, sino que los reductivos también, pero éstos son realizados por la microflora ruminal de los ovinos. Estos organismos son capaces de realizar la sulfo-reducción de los hidroxiderivados, OH-TCBZSO al HO-TCBZ, también pueden reducir el TCBZSO al fármaco padre, TCBZ, pero esta transformación ya no se da con facilidad.

La actividad fasciolicida se ha asociado al sulfóxido, su actividad es similar al TCBZ, por eso el interés mayor está en el TCBZSO. Aunque los hidroxiderivados de TCBZ al igual que TCBZSO₂ son menos potentes que el TCBZ, éstos se unen fuertemente a las proteínas plasmáticas ($\geq 90\%$) lo que da como resultado un tiempo de residencia prolongado en el organismo del animal, que se supone contribuye también a su actividad.³³

Mecanismo de acción

El TCBZ actúa uniéndose a la β -tubulina, que es parte de los microtúbulos (una proteína citoesquelética de las células eucariotas), esta acción la comparte con los demás bencimidazoles.^{34,35}

Los microtúbulos participan en la división celular y en el transporte de gránulos secretorios en el citoplasma de la célula. Cuando el TCBZ se une a la β -tubulina se inhibe la mitosis en las células de función sexual como lo son las células espermátogénicas, además de provocar la interrupción en los procesos de transporte de sustancias o enzimas por vesículas secretorias, que permiten mantener la homeostasis de la célula, en especial mantener la integridad del tegumento, que es la capa más externa del parásito y es la que protege o envuelve al parásito.

Las vesículas secretorias transportan enzimas, nutrientes o materiales de desecho que son llevados a diferentes sitios de la célula. Cuando se da la acción del TCBZ éstas vesículas no pueden ser transportadas al tegumento, por lo que se acumulan dentro de la célula, y llegan a romperse en el citoplasma lo que provoca que se libere su contenido e inicie la lisis de la célula.

Además, cuando al tegumento no llega el material suficiente para mantener su homeostasis se observa un daño gradual en él. Estos cambios morfológicos se han observado en fasciola juvenil como madura por medio de microscopía electrónica, en donde el tegumento se hincha, toma una forma rugosa y se da también la aparición de gránulos hasta llegar a desaparecer, lo que produce la muerte del parásito.³⁶

La alteración provocada por el TCBZ en la superficie tegumental, también se ha observado con el TCBZ-SO *in vitro* e *in vivo*.³⁷

Farmacocinética del Triclabendazol

Al administrar triclabendazol a borregos por vía intrarruminal se encontró que los niveles de sulfóxido y de sulfona en el plasma alcanzaron un C_{max} alrededor de 13 µg/mL a un tiempo (t_{max}) de 18 y 36 horas respectivamente. En el caso de los metabolitos hidroxiderivados éstos se detectan a las 8 horas (t_{max}) el TCBZ-OH, a las 21 horas HO-TCBZ-SO y a las 36 horas el HO-TCBZ-SO₂. Los últimos dos metabolitos se presentan casi al mismo tiempo que sus análogos no hidroxilados, TCBZ-SO y TCBZ-SO₂.

Los parámetros farmacocinéticos de los metabolitos pueden verse afectados por la calidad en la alimentación. Se encontró que después de una alimentación basada en trigo y paja (dieta de baja calidad, alta en fibra, BC) y otra con base en alfalfa y cebada (dieta de alta calidad, baja en fibra, AC) la aparición de los metabolitos fuera más lenta. Para el sulfóxido el t_{max} fue de 27.91 horas con la dieta de BC y con la AC de 16.01 horas, y la sulfona con un t_{max} de 53.91 para dieta BC y para AC de 38.06 horas. Con respecto al tiempo de vida media prácticamente no hubo cambio en ninguno de los dos metabolitos, para el sulfóxido en dieta AC de 19.20 y en BC de 21.98 horas (el reportado es de 16 horas), y para la sulfona de 29.92 y 26.01 horas respectivamente, el tiempo medio de residencia del sulfóxido, el cual fue 40 % mayor que el caso de la dieta de BC en comparación a la de AC. Una situación similar también ocurre con la sulfona.

Si el sulfóxido permanece más tiempo en el organismo con la dieta BC, esto favorece la actividad fasciolicida. Se ha encontrado que a las 87 horas se mantiene a una concentración de 4 µg/mL y para la dieta AC muestra que se mantiene a esta concentración aún a las 68 horas.

Los parámetros farmacocinéticos pueden cambiar de acuerdo a la especie. Así, por ejemplo para caballos el C_{max}, t_{max} y t_{1/2} son 4.57 µg/mL, 8 horas y 9.74 horas, y en el caso de bovinos los valores son 9.64 µg/mL, 40.28 horas y 29.19 horas, respectivamente.

Cepas de fasciola resistentes al triclabendazol

A partir de la mitad del siglo 20 se reporta la aparición de la primera resistencia de fasciola al triclabendazol en una granja de Australia y de ahí en adelante se ha reportado resistencia a este fármaco en países de Europa, como Irlanda, Reino Unido, Suecia y España.^{36,38} También se han documentado casos no confirmados de resistencia al TCBZ en humanos.

Se ha encontrado que las cepas de las formas infectantes resistentes son capaces de metabolizar el TCBZ-SO a su forma inactiva, la sulfona. En un estudio *in vitro* se reporta que la conversión fue de un 20 % más que aquellas cepas que no lo son.³⁹ Otra propuesta es que la resistencia se debe a que el sitio de unión del fármaco a la tubulina se ha modificado, lo que no permite la unión del fármaco a esta proteína.⁴⁰

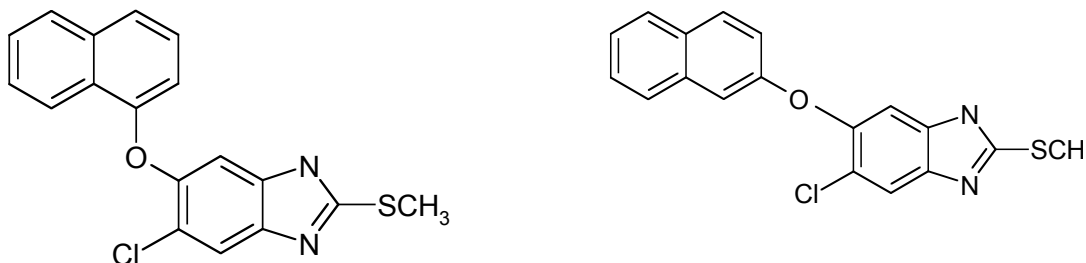
1.3 El alfa (5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol): nuevo agente fasciolicida

En los estudios de relación estructura actividad farmacológica se ha encontrado que en los derivados bencimidazólicos como el triclabendazol la acción está dada por la presencia de un anillo bencimidazólico clorado^{32,41,42}, un grupo metiltio en la posición 2, y los sustituyentes 5 y 6 que son importantes pueden ser sustituidos por otros siempre y cuando se mantenga el requerimiento electrónico en estas posiciones.

Con base en lo anterior y ante la necesidad de contar con nuevas opciones terapéuticas en lo que respecta a fármacos con actividad fasciolicida se sintetizaron nuevos derivados bencimidazólicos. Con la idea de evaluar de manera química y farmacológica estos nuevos productos se conformó un grupo interdisciplinario integrado por las áreas de Química Farmacéutica, Biofarmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química y el Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria; de la Universidad Nacional Autónoma de México.

En 1997 se publicó una propuesta de dos nuevos compuestos derivados del triclabendazol con posible actividad, estos fueron el resultado de sustituir el grupo 1,2-

diclorofenoxi del triclabendazol por un equivalente isostérico, el grupo 1 naftiloxi y el 2 naftiloxi. En la Figura 3 se muestran sus estructuras.



A. Compuesto alfa (α)

B. Compuesto beta (β)

Figura 3. Compuestos derivados del triclabendazol

De la evaluación *in vitro* de ambos compuestos se encontró que a concentraciones de 50, 10, 3.33, 1.11 y 0.37 mg/L utilizando metacercarias enquistadas, el compuesto alfa mostró una eficacia de 100, 100, 77.5, 0.0 y 0.0 % y el compuesto beta de 100, 67.5, 1.75, 0.0 y 0.0 %, respectivamente.⁴³ En la evaluación *in vivo* se utilizaron 45 ovinos, los cuales fueron infectados cada uno con 150 metacercarias de *Fasciola hepática*, a los dos meses fueron tratados en grupos. Un grupo con una dosis oral de 10 y otro de 15 mg/Kg del compuesto alfa y otros dos grupos tratados a las mismas dosis pero del compuesto beta.

Los resultados mostraron una eficacia de 80.6 y 86.9 % para el compuesto alfa mientras que el compuesto beta no fue eficaz a ninguna de las dosis por lo que se seleccionó al compuesto alfa, para continuar con la investigación.

Una vez seleccionado el compuesto alfa, éste se evaluó en estadíos juveniles y adultos de fasciola en ovinos previamente infectados, encontrándose la eficacia a las cuatro semanas (estadío juvenil), con dosis de 10, 15, 22.2 y 30 mg/Kg fue de 82.2, 87.2, 90.8 y 94.3 %, respectivamente, y a las ocho semanas (estadío adulto) de 81.7, 88.1, 87.2 y 90.0 %, respectivamente, lo cual comprueba su actividad como fasciolicida.⁴⁴

Tabla II. Evaluación de cuatro vehículos para mejorar la eficacia del alfa contra fasciola en ovinos

Vehículos	Excipientes (g)	Eficacia contra fasciolas adultas	Eficacia contra fasciolas juveniles
Vehículo 1 Pectina USP Carboximetilcelulosa (baja viscosidad) Carboximetilcelulosa (alta viscosidad) Sacarina USP Metil Parabeno Propil Parabeno	1.5 0.5 0.5 0.2 0.5 0.03	100 %	100%
Vehículo 2 Carboximetilcelulosa (baja viscosidad) Carboximetilcelulosa (media viscosidad) Sacarina USP Metil Parabeno Propil Parabeno Sacarosa	1.0 0.4 0.2 0.5 0.03 0.8	100%	100%
Vehículo 3 Propil Parabeno Metil Parabeno Azúcar Carbopol 940 Goma Tragacanto Metilcelulosa Carboximetilcelulosa (media viscosidad) Avicel PH 101	0.05 0.18 15 0.063 0.068 0.25 0.013 0.5	92.4%	
Vehículo 4 Propil Parabeno Metil Parabeno Carboximetilcelulosa (media viscosidad)	0.02 0.18 1.2	77.0 %	

Posteriormente se evaluó su eficacia *in vivo* (en borregos) utilizando contra fasciola en estado maduro (10 semanas) y juvenil (4 semanas) cuatro diferentes vehículos (Tabla II) para mejorar la eficacia.⁴⁵ De los cuatro vehículos utilizados se encontró que la eficacia sobre fasciola madura es de un 100 % para los vehículos 1 y 2, no así para los otros. Con el éxito logrado con estas dos formulaciones se comprobó su eficacia en estadios juveniles, obteniéndose con ambas un 100 %. De ambas formulaciones fue elegido el vehículo 1 (constituido por pectina, carboximetilcelulosa, sacarina y parabenos), con el cual se hizo un estudio más detallado para ver el alcance de la formulación. Así, utilizando ovinos raza *Pelibuey* previamente infectados se comprobó

la eficacia a los tres y dos días, a las cuatro, seis, ocho y diez semanas de inoculación con fasciola a una dosis de 15 mg/Kg, el resultado es que la eficacia en todos los estadíos fue de un 100 %.⁴⁶

Con el fin de completar el estudio se observó el efecto del alfa (a una dosis de 10 mg/Kg) sobre el parásito, extraído en hígado de ovinos después de tres semanas de infección a las 6, 12 y 24 horas de administrado el fármaco. Las observaciones se realizaron por microscopía electrónica, encontrándose en la fasciola una inflamación inicial del tegumento (6 horas), con una posterior formación de gránulos sobre su superficie (12 horas) y con exposición de la lámina basal del parásito al cabo de las 24 horas.⁴⁷ Este daño sugiere la alteración de los microtúbulos del parásito y la inhibición en el transporte de vesículas secretorias de la célula a la superficie del tegumento, mecanismo de acción que es similar al encontrado para el triclabendazol.

Los estados de fasciola juveniles *in vivo* se ven más afectados en el tegumento que los estados adultos, esto se debe a que la concentración del metabolito, el sulfóxido, es mayor a nivel hepático, lugar donde está alojada la fasciola en su forma joven, no así los estados adultos.

En resumen, el alfa es un fasciolicida con excelente eficacia para los diferentes estadíos de la fasciola y en cepas de fasciola resistentes al triclabendazol⁴⁸, además de presentar buena seguridad en las dosis de 10 a 15 mg/Kg en ovinos.

2. Parte Experimental

2.1 Método analítico para la cuantificación del compuesto alfa y sus metabolitos sulfóxido y sulfona en plasma

2.1.1 Reactivos y equipo

Reactivos

- Compuesto alfa (α), sulfóxido del α (α -SO), sulfona del α (α -SO₂) y sulfóxido de albendazol (ABZ-SO) sintetizados en el laboratorio 122 del Departamento de Farmacia de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM
- Metanol (grado cromatográfico), J.T. Baker
- Acetonitrilo (grado cromatográfico), J.T. Baker
- Agua destilada y desionizada
- Balanza analítica, Sartorius analytic, A210P, 0.1mg
- Baño de ultrasonido modelo MF, Mettler Electronics
- Baño de agua modelo Imperial IV. Lab line
- Cartuchos Sep-Pak Vac 3 cc (500 mg) Waters

Equipo

- Cromatógrafo líquido de alta resolución Shimadzu equipado con las siguientes unidades:
 - Bomba LC-10AD *VP*
 - Automuestreador SIL-10 A
 - Detector SPD-10A *VP*
 - Controlador del sistema SCL-10A *VP*

2.1.2 Preparación de soluciones

Solución patrón de los estándares de referencia de alfa y de sus metabolitos α -SO y α -SO₂ (disolución estándar)

En un matraz volumétrico de 25 mL se colocaron 8 mg de cada uno de los estándares de referencia de alfa y sus metabolitos (el sulfóxido y la sulfona), se disolvieron en 10 mL de metanol HPLC y se colocó en baño de ultrasonido por 10 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente, y se llevó a volumen con el mismo disolvente. La concentración que se obtiene es para cada uno de los compuestos de 320 μ g/mL.

Solución patrón de estándar interno

En un matraz volumétrico de 50 mL se colocaron 7.5 mg del sulfóxido de albendazol (ABZ-SO) se disolvió en 25 mL de metanol grado HPLC y, se sometió a baño de ultrasonido por 10 min, se dejó enfriar y se llevó a la marca de aforo con el mismo disolvente. La concentración obtenida del estándar interno fue de 150 μ g/mL.

2.1.3 Curva de Calibración

Se tomó una alícuota de 0.4 mL de la disolución estándar y se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL. Se llevó a volumen con plasma y se agitó en vortex para homogenizar. La concentración obtenida es de 12,8 μ g/mL en alfa y cada uno sus metabolitos

Las concentraciones utilizadas para preparar la curva de calibración fueron las siguientes: 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 y 12.8 μ g/mL. La curva se llevó a cabo por diluciones sucesivas. En la Figura 4 se presenta la preparación de cada una de las concentraciones de la curva.

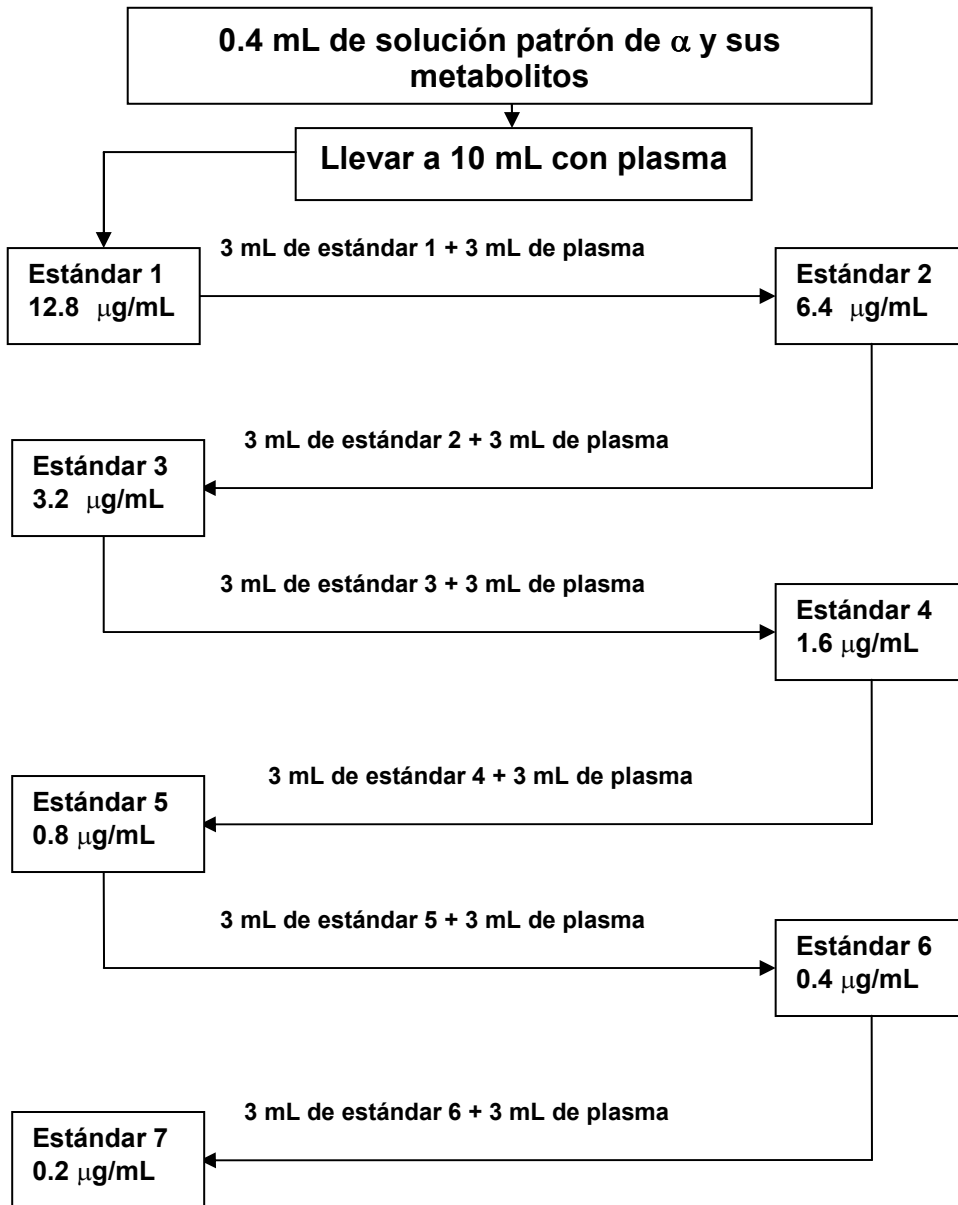


Figura 4. Esquema de la preparación de la curva de calibración del alfa y sus metabolitos

Preparación de las concentraciones control del compuesto alfa y de sus metabolitos (para α -SO y el α -SO₂)

Se midió una alícuota de 300 μ L de la disolución estándar (320 μ g/mL), y se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL y se llevó a la marca de aforo con plasma. La concentración preparada fue de 9.6 μ g/mL (control alto). De esta última se tomaron 2.5 mL y 0.625 mL y se colocaron en sendos matraces volumétricos de 10 mL, se llevó a volumen con plasma para obtener las siguientes concentraciones respectivamente de 2.4 μ g/mL (control medio) y 0.6 μ g/mL (control bajo).

2.1.4 Procedimiento de extracción

Se siguió el siguiente procedimiento:

- En un tubo de ensayo de 10 mL se colocó una alícuota de 2 mL de plasma
- Se adicionaron 100 μ L de la solución patrón del estándar interno (sulfóxido de albendazol, 150 μ g/mL)
- Se agitó durante 30 s en un agitador tipo Vortex
- El cartucho de extracción en fase sólida Sep Pak C18 se activó con 5 mL de metanol y 4 mL de agua HPLC
- Se trasvasó el contenido del tubo al cartucho de extracción activado
- El cartucho se lavó con 10 mL de agua HPLC
- Los compuestos alfa, α -SO, α -SO₂ y el sulfóxido de albendazol (ABZ-SO) se eluyeron con 3 mL de metanol HPLC
- El volumen eluido contenido en el tubo se colocó en un baño de agua a 40 °C y se evaporó bajo una corriente de nitrógeno hasta sequedad
- El residuo se reconstituyó con 0.5 mL de metanol HPLC
- Se inyectaron 20 μ L al cromatógrafo en las condiciones descritas en la sección, 2.1.5

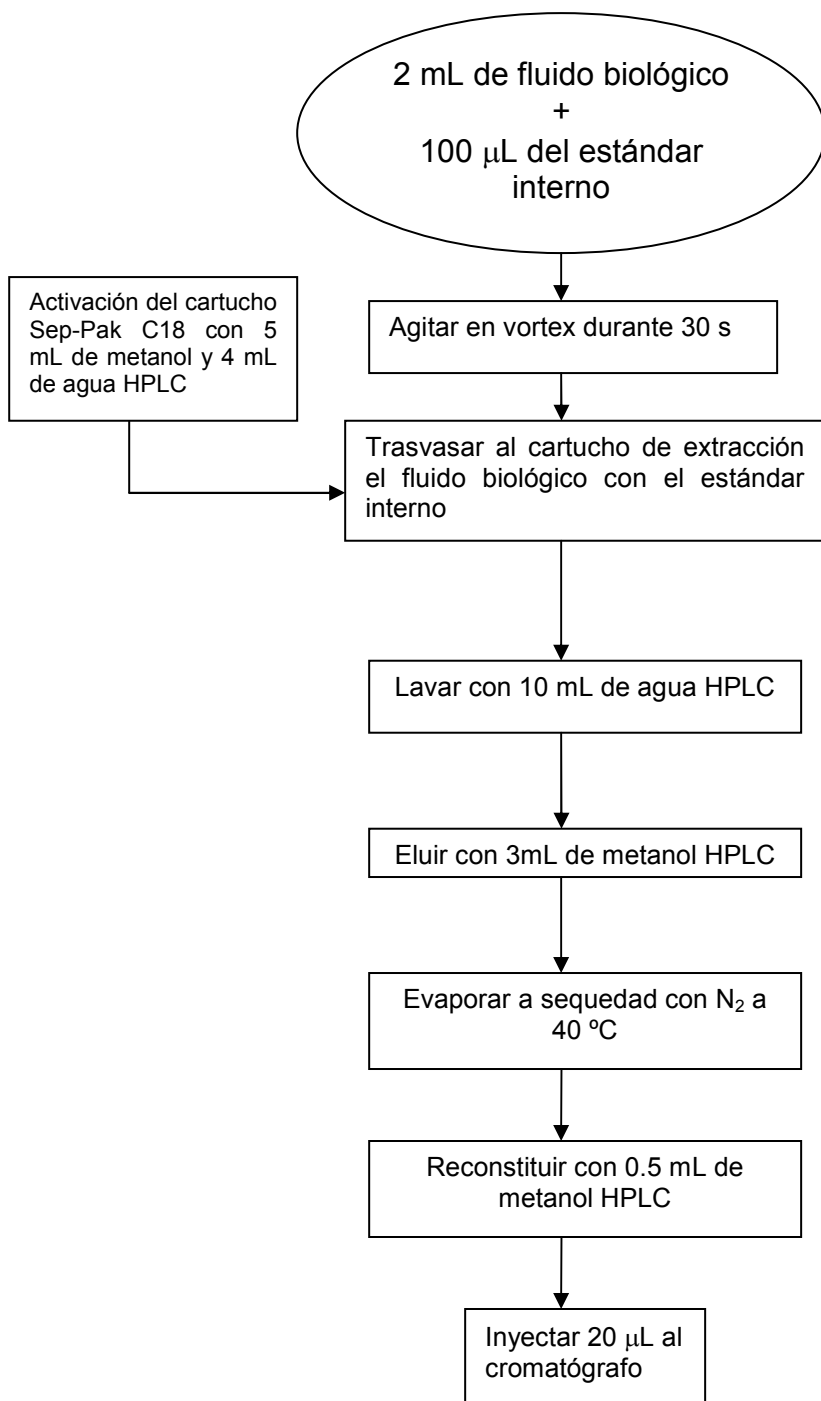


Figura 5. Esquema del procedimiento de extracción empleado para el alfa y sus metabolitos

En la Figura 5 se presenta el esquema del procedimiento utilizado en la activación de los cartuchos y la extracción en fase sólida de las muestras en plasma. Los cartuchos fueron reutilizados hasta tres veces previo lavado con 10 mL de agua HPLC y 5 mL metanol.

2.1.5 Condiciones Cromatográficas

- Columna C18, μ Bondapak, 10 micras, 300 x 3.9 mm. Waters
- Fase móvil: metanol, acetonitrilo (ACN) y solución amortiguadora de acetatos (10 mM, pH 5.00) en proporción 40:30:30 (la fase móvil se filtró al vacío y se desgasificó en baño de ultrasonido durante 25 minutos)
- Velocidad de flujo 1.0 mL/min
- Presión 90 Kgf/cm²
- Temperatura ambiente
- Tiempo de corrida 14 min
- Longitud de onda 304 nm
- Volumen Inyección 20 μ L

2.2 Validación del método analítico

La validación del método analítico se realizó de acuerdo con las guías y normas oficiales.^{49, 50} Se evaluaron los siguientes parámetros:

- Selectividad
- Linealidad
- Precisión
- Exactitud
- Límite de cuantificación
- Estabilidad

2.2.1 Selectividad

Se analizaron las siguientes muestras:

- un blanco de plasma
- plasma adicionado con ABZ-SO,
- plasma adicionado con el compuesto alfa
- plasma adicionado con el α -SO y
- plasma adicionado con la α -SO₂

La concentración de cada uno de los analitos fue de 12.8 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras se procesaron según el procedimiento descrito en 2.1.4.

Criterio de aceptación: No deben existir interferencias de los componentes del plasma en los tiempos de retención de los compuestos ni del estándar interno.

2.2.2 Linealidad

El intervalo de trabajo se estableció entre 0.2 y 12.8 $\mu\text{g/mL}$. Se prepararon tres curvas de calibración en el mismo día con el fluido biológico (plasma) en las siguientes concentraciones para alfa y sus metabolitos: 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 y 12.8 $\mu\text{g/mL}$.

Se estableció el modelo al cual se ajustan los datos utilizando como criterio la suma de cuadrados residuales. Se calculó el coeficiente de variación porcentual (%CV) y el porcentaje de desvío absoluto (%desvabs) a cada nivel de concentración.

Criterio de aceptación: El modelo elegido es aquel cuya suma de cuadrados residuales sea el más pequeño con respecto a los otros modelos probados y que su coeficiente de determinación sea mayor o igual a 0.98; también que la desviación absoluta en cada nivel de concentración se encuentre menor o igual al 15 % excepto para el valor más bajo, que puede ser hasta de un 20 %.

2.2.3 Recobro absoluto

Se analizaron por triplicado las concentraciones de control bajo (0.6 µg/mL), medio (2.4 µg/mL) y alto (9.6 µg/mL) en plasma y metanol. El porcentaje de recobro se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Recobro absoluto(\%)} = \frac{\text{Respuesta plasma}}{\text{Respuesta metanol}} \times 100$$

Criterio de aceptación: El porcentaje de recobro no debe ser necesaria del 100 %, pero debe ser reproducible en los diferentes niveles de concentración.

2.2.4 Precisión del método

Precisión intradía (Repetibilidad)

Se evaluó por triplicado cada uno de los puntos control conteniendo los diferentes analitos en un mismo día. La respuesta se extrapoló en una curva de calibración preparada el día de análisis. Se determinó la cantidad recuperada promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Criterio de aceptación: el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

Precisión interdía (Reproducibilidad)

Se analizaron por triplicado durante tres días diferentes los puntos control (bajo, medio y alto). Cada día de estudio se preparó y analizó una curva de calibración. Se determinó la cantidad recuperada promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación en el periodo de tres días.

Criterio de aceptación: El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15 %.

2.2.5 Exactitud

De los datos de repetibilidad y reproducibilidad (en concentración), se calculó el porciento de desviación absoluta (desvabs) utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de desviación absoluta} = ABS \left(100 \times \frac{\text{conc.nominal} - \text{conc.obtenida}}{\text{conc.nominal}} \right)$$

Concentración nominal: concentración de la solución estándar

Concentración obtenida: concentración experimental calculada a partir de la respuesta interpolada de la muestra

ABS: función que transforma a un valor positivo o valor absoluto

Se calculó la exactitud de tres días, calculando el promedio para cada día a cada una de las concentraciones control y el promedio total en el periodo de tiempo.

Criterio de aceptación: el valor promedio de las determinaciones a cada nivel de concentración debe estar dentro del 15 % del valor nominal.

2.2.6 Límite de cuantificación

Se analizó por quintuplicado la concentración más baja que de acuerdo con el intervalo de trabajo corresponde a 0.2 µg/mL para el compuesto alfa y sus metabolitos.

Criterio de aceptación: la concentración debe presentar una respuesta cinco veces mayor que la respuesta del blanco. Debe cumplir los criterios de precisión y exactitud. El coeficiente de variación y el porcentaje de desviación absoluta no debe ser mayor al 20 %.

2.2.7 Estabilidad de muestra procesada

Se prepararon los puntos control, se procesaron y se dividieron en dos series. Una serie se analizó inmediatamente. La otra serie se mantuvo en el inyector durante 24 horas (tiempo estimado de permanencia de las muestras) y transcurrido este tiempo se inyectaron.

Criterio de aceptación: la desviación absoluto de los resultados obtenidos a las cero y a las 24 horas no debe ser mayor al 15 %.

2.3 Método de análisis para la cuantificación del sulfóxido del alfa en solución amortiguadora pH 7.4

2.3.1 Preparación de soluciones

Preparación de la solución amortiguadora de fosfatos 0.067 M, pH 7.4

Pesar 9.1180 g de una sal anhidra de fosfato monobásico de potasio, disolver en 850 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 7.4 con hidróxido de sodio 1 M. Trasvasar a un matraz volumétrico de un litro y aforar con agua desionizada.

Preparación de la solución de trabajo

En un matraz volumétrico de 5 mL colocar 12.5 mg del sulfóxido del alfa añadir 3 mL de metanol HPLC y sonicar por 10 minutos. Dejar enfriar y llevar a la marca de aforo con el mismo disolvente. La concentración obtenida es de 2500 $\mu\text{g/mL}$.

2.3.2 Curva de calibración

En un matraz volumétrico de 20 mL colocar 64 μL de la solución de trabajo y añadir 136 μL de metanol HPLC y llevar al aforo con el amortiguador de 0.067 M en fosfatos pH 7.4. La concentración obtenida es de 8 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla III. Preparación de la curva para el sulfóxido del alfa en solución amortiguadora de fosfatos 0.067 M pH 7.4

Volumen (mL) Patrón 8 $\mu\text{g/mL}$	Volumen de aforo (mL)	Concentración obtenida ($\mu\text{g/mL}$)
0.625	5	1
1.250	5	2
1.875	5	3
2.500	5	4
3.125	5	5
3.750	5	6

De cada una de las concentraciones (ver Tabla III) tomar 0.5 mL y colocar en un tubo de ensayo, extraer con 1 mL de acetato de etilo agitando por vortex durante 30 segundos. Tomar la capa superior y colocarla en un tubo limpio y seco y evaporar a 40 °C bajo corriente de nitrógeno por aproximadamente 15 minutos. Reconstituir con, 0.5 mL de metanol, e inyectar 40 µL en el cromatógrafo de líquidos utilizando las condiciones descritas en la sección 2.1.5. Tiempo de corrida 10 minutos.

2.4 Estudio Farmacocinético en borregos

2.4.1 Reactivos, materiales y equipo

- Tubos heparinizados de 7 mL
- Aguja estéril Vacutainer
- Centrífuga
- Congelador a -20 °C
- Gasa
- Aguja estéril
- Alcohol y yodo-povidona
- Guantes desechables
- Gradillas

2.4.2 Formulación administrada

Se administró una suspensión al 10 % del compuesto alfa. La formulación fue desarrollada en el Laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Química.

2.4.3 Farmacocinética en borregos

El estudio en borregos se realizó en el Centro de Producción e Investigación para la Sanidad Animal (CEPIPSA), el cual está ubicado en Topilejo, carretera a Cuernavaca. El centro facilitó el personal técnico, las instalaciones y el mantenimiento de 8 borregos *Pelybuey* durante el estudio de la farmacocinética, previa aprobación del protocolo de trabajo.

Tabla IV. Pesos de los borregos utilizados para el estudio farmacocinético del alfa y las dosis (mg) administradas en una suspensión al 10 % de alfa

Borrego	Peso (Kg)	Dosis (mg)
1	55.0	660
2	51.0	612
3	55.5	666
4	59.0	708
5	49.0	588
6	59.5	714
7	53.5	642
8	60.5	728

Los borregos se encontraban con un peso entre 50 y 60 Kg (Ver Tabla IV), a los cuales se les administró una suspensión del compuesto alfa al 10 % por vía oral a una dosis de 12 mg/Kg. Los tiempos de muestreo fueron los siguientes: blanco (tiempo 0), 0.5 , 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36, 48, 72, 96, 120 y 144 horas. Las muestras se tomaron por venupunción yugular utilizando agujas (18G) y tubos vacutainer heparinizados (de 6 mL). Las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos para separar el plasma, el cual se almacenó a -20 °C sin conservadores en tubos con tapa limpios hasta el momento de su análisis, utilizando el método previamente validado.

Para obtener la concentración a cada tiempo de muestreo, los valores de respuesta se interpolaron en la curva de calibración y se graficaron utilizando el paquete computacional Origin 6.0. Para determinar los parámetros farmacocinéticos se utilizó el programa WinnoLin 4.0.1.

2.5 Unión a proteínas del sulfóxido del compuesto alfa

El método para unión a proteínas se basó en el método de diálisis al equilibrio.^{51, 52}

2.5.1 Reactivo, materiales y equipo

- Aparato dializador que consta:

- 5 celdas de teflón
- 6 separadores de metal
- Motor de rotación
- 30 tapones para las celdas
- Agujas sin punta
- Jeringas de 1 mL
- Membranas Spectra/Por Dialysis No 2, MWCO:14,000, 200x200 mm, lote 132686
- Baño de agua Imperial IV
- Termómetro
- Pinzas sin punta
- Acetato de etilo RA Mallinkrodt
- Nitrógeno industrial comprimido

2.5.2 Tiempo de equilibrio

El tiempo de equilibrio se estableció utilizando el equipo de diálisis que consta de cinco celdas de dos compartimentos de 1 mL de capacidad cada uno. Los compartimentos se encontraban separados por una membrana de celulosa con un para evitar el paso de compuestos de peso molecular de 14000 dalton. En un compartimento de la celda se colocó un mililitro de plasma conteniendo el sulfóxido del alfa a una concentración de 12.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en el otro una solución amortiguadora de fosfatos de 0.067 M, pH 7.4 sin el metabolito. El sistema de las cinco celdas se colocó en un baño con agua a 37.0 °C con una rotación de 15 rpm. Se tomaron muestras a las 2, 4, 5, 6 y 8 horas, del compartimento con plasma y del compartimento con solución amortiguadora, se tomó de cada uno un volumen de 0.5 mL de muestra y se analizó respectivamente por los métodos propuestos en las secciones 2.1 y 2.3.

2.5.3 Unión del sulfóxido del compuesto alfa a proteínas plasmáticas totales

El estudio se llevó a cabo colocando en uno de los compartimentos de la celda, 1 mL de plasma conteniendo 12.8 $\mu\text{g/mL}$ del sulfóxido del alfa y se dializó contra 1 mL de un amortiguador de fosfatos de pH 7.4, 0.067 M. Durante 6 horas en baño con agua a una temperatura de 37 °C y a 15 rpm. Al final de la diálisis se tomó un volumen de 0.5 mL de las muestras de cada uno de los compartimentos y se cuantificaron de acuerdo con lo descrito en la secciones 2.1 y 2.3. La diálisis también se realizó utilizando una concentración de 6.4 $\mu\text{g/mL}$ del sulfóxido del alfa en plasma. Se utilizó un control que consiste en analizar 0.5 mL de la solución patrón de sulfóxido en plasma de sulfóxido a las dos concentraciones de estudio, 6.4 y 12.8 $\mu\text{g/mL}$, pero sin dializar.

2.5.4 Análisis de los datos

Se calculó el porcentaje del sulfóxido del alfa unido (%unido) mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{unido} = 100 \left[1 - \left(\frac{C_i - C_{eq}}{C_{eq}} \right) \right]$$

C_i es la concentración inicial del sulfóxido antes de dializar, C_{eq} es la concentración en el equilibrio (después de la diálisis), el término $\left(\frac{C_i - C_{eq}}{C_{eq}} \right)$ representa la fracción del fármaco libre.

3. Resultados y Análisis

3.1 Método analítico para la cuantificación del alfa y sus metabolitos sulfóxido y sulfona en plasma

3.1.1 Condiciones cromatográficas

Se utilizó el método analítico reportado por Del Rivero⁵³ para el compuesto alfa y sus metabolitos, en el cual la fase móvil era acetonitrilo, agua HPLC y metanol, en las condiciones actuales del sistema cromatográfico no se logró la separación entre las señales del sulfóxido y la sulfona del alfa (Figura 6), obteniéndose una resolución de 0.76, por lo que fue necesario modificar la fase utilizando en lugar de agua un amortiguador de fosfatos pH 5.00 y de esta manera separar las especies por su polaridad. Al utilizar esta fase móvil se logró la separación de las señales de los metabolitos con una resolución de 2.5 (Ver Figura 7 A).

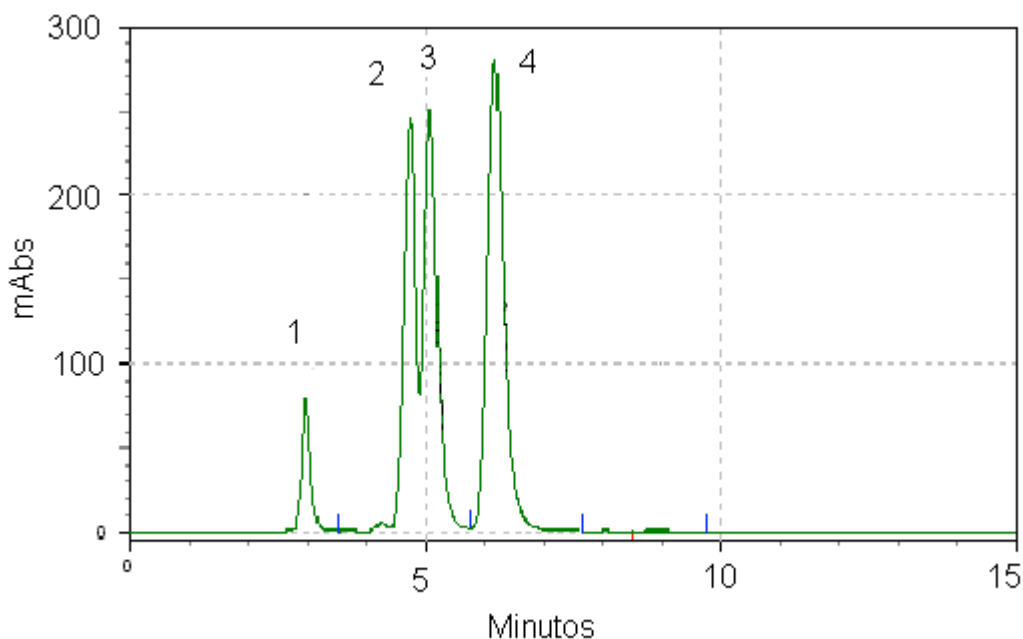


Figura 6. Cromatograma de una mezcla del alfa y sus metabolitos, y el estándar interno (sulfóxido de albendazol) en plasma. Condiciones cromatográficas: columna μ -Bondapak, 10 μ , 300x3.9 mm, flujo 1.0mL/min, 304 nm, fase móvil metanol:acetonitrilo:agua (40:30:30). 1. Señal del sulfóxido del albendazol. 2. Señal de la sulfona del compuesto alfa. 3. Señal del sulfóxido del alfa. 4. Señal del compuesto alfa

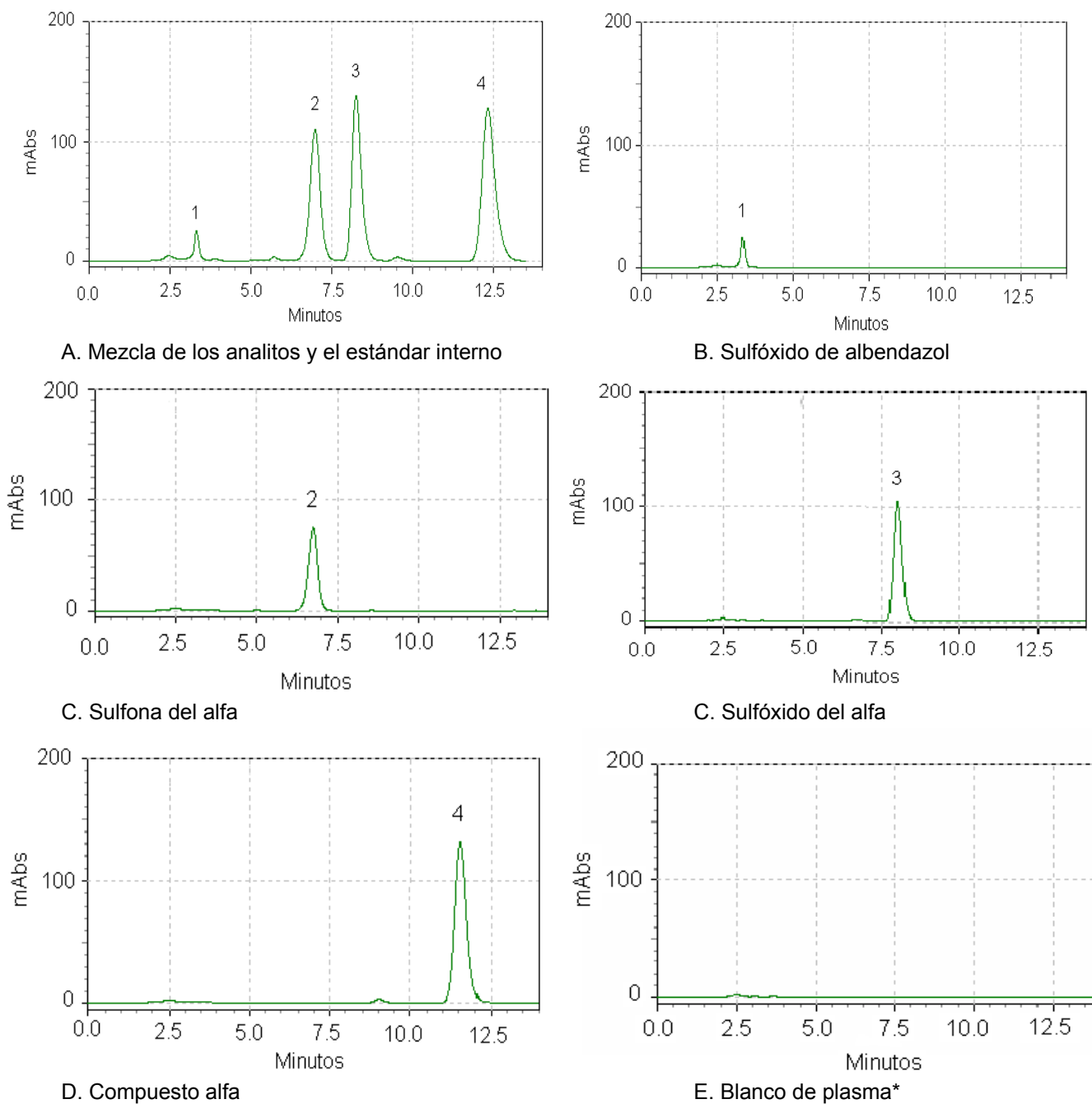


Figura 7. Cromatogramas del alfa y sus metabolitos; y del estándar interno (sulfóxido de albendazol) en plasma. Condiciones cromatográficas: columna μ -Bondapak, 10 μ , 300x3.9 mm, flujo 1.0mL/min, 304 nm, fase móvil metanol:acetonitrilo:amortiguador de acetato 10 mM, pH 5 (40:30:30). *Ver en Apéndice F ampliación del cromatograma del blanco de plasma.

3.2 Validación del método analítico

3.2.1 Selectividad

En la Figura 7 se presentan los cromatogramas correspondientes al plasma adicionado con estándar interno, sulfóxido de albendazol, el compuesto alfa y sus dos metabolitos.

Los tiempos de retención encontrados fueron los siguientes:

Sulfóxido de albendazol:	3.3 min
Sulfona del alfa	6.9 min
Sulfóxido del alfa	8.2 min
Alfa	12.3 min

No se encontraron interferencias de los componentes del plasma en la región cromatográfica correspondiente al fármaco y sus metabolitos, por lo que el método analítico se consideró selectivo para cuantificarlos.

3.2.2 Linealidad

La elección del mejor modelo para los datos de respuesta vs concentración se basó en el ajuste que presentara la menor suma de cuadrados residuales. Como se observa en la Tabla V el modelo matemático logX-log A (potencia) fue el más adecuado.

Tabla V. Suma de cuadrados residuales para cada uno de los modelos

Modelo matemático	Analito		
	Alfa	Sulfona	Sulfóxido
LogX-log A (exponencial)	13.681	28.541	12.465
X vs Respuesta (lineal)	39.106	44.5308	28.569
X vs A (lineal)	1116.017	35.344	52.425
X vs log A (logarítmica)	1808.746	1119.441	1115.712
Log X vs Log Respuesta (potencia)	15.819	36.09	15.007

X: concentración, µg/mL; Respuesta: áreas; A: relación de áreas del analito y estándar interno

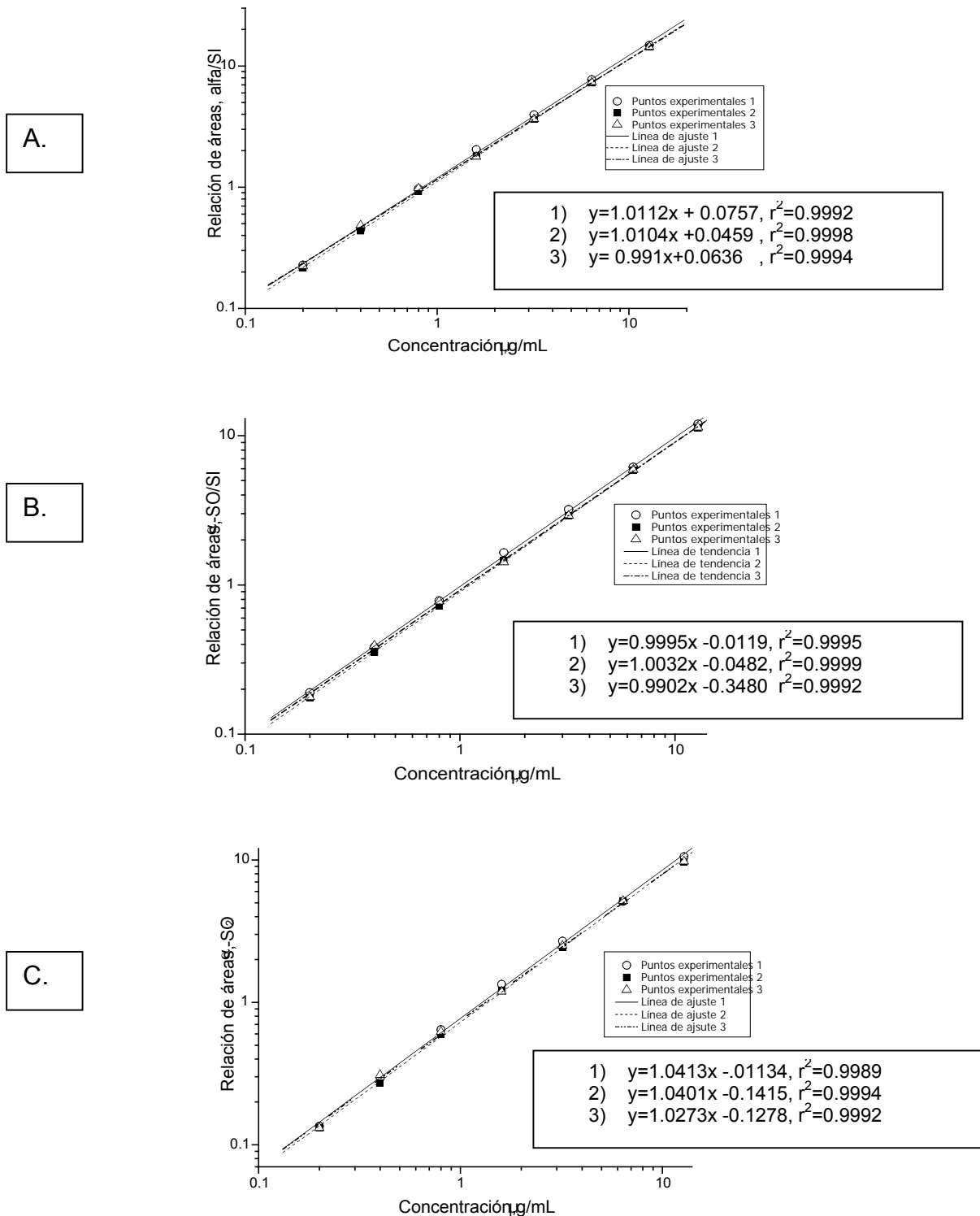


Figura 8. Análisis de linealidad con el modelo de mejor ajuste para cada uno de los analitos en plasma. Panel A. Linealidad para el alfa. Panel B. Linealidad para el $\alpha\text{-SO}$. Panel C. Linealidad para el $\alpha\text{-SO}_2$. $y = \log_{10}$ relación de áreas, $x = \log_{10}$ de la concentración, SI: estándar interno, sulfóxido de albendazol

En la Figura 8 se muestran las curvas de calibración en plasma para el compuesto alfa y para cada uno de sus metabolitos, el sulfóxido y la sulfona.

Al utilizar el modelo en cada nivel de concentración de la curva de calibración para cada uno de los analitos se cumplió con el criterio de aceptación de que el %CV no debe ser mayor a 15 %, para la concentración más baja menor al 20 %. Los datos se muestran en las Tablas VI, VII y VIII.

Es importante destacar que a la concentración de 0.2 µg/mL, que es la más baja de la curva, el coeficiente de variación (%CV) siempre estuvo debajo del 20 % para cada uno de los analitos.

En la Tabla IX se observa que los coeficientes de correlación están alrededor 0.999, por lo que cumple con los criterios de aceptación para cada uno de los analitos.

Tabla VI. Evaluación de la exactitud de las curvas de calibración para el fármaco alfa

Concentración nominal (µg/mL)	Replica 1 Concentración recuperada	Replica 2 Concentración recuperada	Replica 3 Concentración recuperada	Replica 1 % desv abs*	Replica 2 % desv abs	Replica 3 % desv abs	% CV**
0.2	0.190	0.191	0.195	4.93	4.30	2.50	1.31
0.4	0.374	0.385	0.423	6.45	3.63	5.63	6.41
0.8	0.807	0.815	0.853	0.93	1.90	6.63	2.96
1.6	1.704	1.620	1.551	6.47	1.27	3.09	4.72
3.2	3.305	3.221	3.183	3.27	0.64	0.54	1.93
6.4	6.442	6.438	6.411	0.65	0.60	0.17	0.26
12.8	12.366	12.786	12.485	3.39	0.11	2.46	1.72

*%desvabs: porcentaje de desvío absoluto

**%CV: coeficiente de variación porcentual

Tabla VII. Evaluación de la exactitud de las curvas de calibración para el sulfóxido del alfa

Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Replica 1 Concentración recuperada	Replica 2 Concentración recuperada	Replica 3 Concentración recuperada	Replica 1 % desv abs*	Replica 2 % desv abs	Replica 3 % desv abs	% CV**
0.2	0.195	0.196	0.194	2.47	2.02	3.16	0.59
0.4	0.393	0.395	0.429	1.64	1.27	7.35	5.02
0.8	0.807	0.806	0.848	0.82	0.69	6.05	2.98
1.6	1.691	1.614	1.552	5.68	0.87	3.00	4.29
3.2	3.294	3.228	3.179	2.94	0.88	0.64	1.78
6.4	6.340	6.522	6.454	0.94	1.90	0.83	1.42
12.8	12.302	12.526	12.394	3.89	2.14	3.17	0.91

*%desvabs: porciento de desvío absoluto

**%CV: coeficiente de variación porcentual

Tabla VIII. Evaluación de la exactitud de las curvas de calibración para la sulfona del alfa

Concentración nominal ($\mu\text{g/mL}$)	Replica 1 Concentración recuperada	Replica 2 Concentración recuperada	Replica 3 Concentración recuperada	Replica 1 % desv abs*	Replica 2 % desv abs	Replica 3 % desv abs	% CV**
0.2	0.169	0.176	0.171	15.63	12.24	14.44	2.01
0.4	0.366	0.360	0.404	8.54	9.91	0.96	6.29
0.8	0.802	0.794	0.813	0.21	0.70	1.57	1.14
1.6	1.666	1.615	1.556	4.14	0.95	2.75	3.42
3.2	3.357	3.241	3.256	4.91	1.30	1.76	1.91
6.4	6.374	6.877	6.717	0.41	7.46	4.95	3.86
12.8	13.129	12.858	12.725	2.57	0.45	0.58	1.59

*%desvabs: porciento de desvío absoluto

**%CV: coeficiente de variación porcentual

Tabla IX. Evaluación de la linealidad para el alfa y sus metabolitos

Analito	Curva	Pendiente (b)	Intercepto (log a)	r^2	r
Alfa	1	1.0112	0.0757	0.9992	0.9996
	2	1.0104	0.0459	0.9998	0.9999
	3	0.9910	0.0636	0.9994	0.9997
α -SO	1	0.9995	-0.0119	0.9995	0.9998
	2	1.0032	-0.0482	0.9999	0.9999
	3	0.9902	-0.0348	0.9992	0.9996
α -SO ₂	1	1.0413	-0.1134	0.9989	0.9995
	2	1.0401	-0.1415	0.9994	0.9997
	3	1.0273	-0.1278	0.9988	0.9994

3.2.3 Recobro absoluto

Los resultados de recobro se presentan en las Tablas X, XI y XII. En ellas se puede observar que para el compuesto alfa fue de 95 a 102, para el sulfóxido de 94 a 102 % y para la sulfona de 88 a 99 %; por lo que el método cumple con los criterios establecidos.

Tabla X. Recobro absoluto para el alfa

Réplica	Punto bajo (0.6 µg/mL)			Punto medio (2.4 µg/mL)			Punto alto (9.60 µg/mL)		
	Relación áreas Metanol	Relación áreas Plasma	% Recobro	Relación áreas Metanol	Relación áreas Plasma	% Recobro	Relación áreas Metanol	Relación áreas Plasma	% Recobro
1	0.820	0.756	92	3.182	2.987	94	11.381	11.607	102
2	0.818	0.765	94	3.081	3.050	99	11.770	11.866	101
3	0.789	0.790	100	3.187	3.029	95	11.110	11.376	102
promedio	0.809	0.770	95	3.150	3.022	96	11.420	11.616	102
DSTD	0.017	0.018	4	0.06	0.03	2.68	0.33	0.25	0.82
%CV	2.14	2.29	4.41	1.90	1.06	2.80	2.90	2.11	0.81

Tabla XI. Recobro absoluto para el sulfóxido del alfa

Réplica	Punto bajo (0.6 µg/mL)			Punto medio (2.4 µg/mL)			Punto alto (9.60 µg/mL)		
	Relación áreas Metanol	Relación áreas Plasma	% Recobro	Relación áreas Metanol	Relación áreas Plasma	% Recobro	Relación áreas Metanol	Relación áreas Plasma	% Recobro
1	0.676	0.624	92	2.608	2.416	93	9.261	9.476	102
2	0.669	0.628	94	2.509	2.454	98	9.608	9.667	101
3	0.660	0.638	97	2.593	2.438	94	9.022	9.335	103
promedio	0.668	0.630	94	2.57	2.44	95	9.297	9.493	102
DSTD	0.01	0.01	2.21	0.05	0.02	2.68	0.29	0.17	1.44
%CV	1.20	1.14	2.34	2.08	0.78	2.82	3.17	1.76	1.41

Tabla XII. Recobro absoluto para la sulfona del alfa

Réplica	Punto bajo (0.6 µg/mL)			Punto medio (2.4 µg/mL)			Punto alto (9.60 µg/mL)		
	Relación áreas Metanol	Relación áreas Plasma	% Recobro	Relación áreas Metanol	Relación áreas Plasma	% Recobro	Relación áreas Metanol	Relación áreas Plasma	% Recobro
1	0.619	0.557	90	2.424	2.150	89	8.56	8.458	99
2	0.618	0.531	86	2.336	2.150	92	8.892	8.66	97
3	0.602	0.534	89	2.411	2.142	89	8.27	8.329	101
promedio	0.613	0.541	88	2.390	2.147	90	8.574	8.482	99
DSTD	0.01	0.01	2.08	0.05	0.00	1.89	0.31	0.17	1.67
%CV	1.56	2.63	2.35	1.99	0.22	2.10	3.63	1.97	1.68

3.2.4 Precisión del método

Precisión intradía (Repetibilidad)

De los datos de precisión intradía (Tablas XIII, XIV y XV) se puede observar que los valores de %CV están entre 1 y 2.5 % para los tres analitos. Por lo que se cumple con el criterio de aceptación de que el %CV debe ser menor del 15%.

Tabla XIII. Repetibilidad del compuesto alfa en plasma

No. Réplica	Punto bajo (0.6 µ/mL)	Punto medio (2.4 µ/mL)	Punto alto (9.6 µ/mL)
	Concentración recuperada)	Concentración recuperada	Concentración recuperada
1	0.6828	2.5884	9.6531
2	0.6907	2.6421	9.8620
3	0.7126	2.6244	9.4672
Promedio	0.70	2.62	9.7
DSTD*	0.02	0.03	0.2
% CV**	2.22	1.05	2.04

*DSTD: desviación estándar

**%CV: coeficiente de variación porcentual

Tabla XIV. Repetibilidad del sulfóxido del alfa en plasma

	Punto bajo (0.6 µ/mL)	Punto medio (2.4 µ/mL)	Punto alto (9.6 µ/mL)
No. Réplica	Concentración recuperada)	Concentración recuperada	Concentración recuperada
1	0.7033	2.6212	9.8982
2	0.7078	2.6617	10.0918
3	0.7180	2.6447	9.7541
Promedio	0.710	2.64	9.91
DSTD*	0.01	0.02	0.2
% CV**	1.06	0.77	1.71

*DSTD: desviación estándar

**%CV: coeficiente de variación porcentual

Tabla XIV. Repetibilidad de la sulfona del alfa en plasma

	Punto bajo (0.6 µ/mL)	Punto medio (2.4 µ/mL)	Punto alto (9.6 µ/mL)
No. Réplica	Concentración recuperada)	Concentración recuperada	Concentración recuperada
1	0.7302	2.6689	9.9395
2	0.6970	2.6694	10.1674
3	0.7012	2.6601	9.7937
Promedio	0.71	2.67	10.0
DSTD*	0.02	0.01	0.2
% CV**	2.55	0.20	1.90

*DSTD: desviación estándar

**%CV: coeficiente de variación porcentual

Precisión interdía (Reproducibilidad)

Para la precisión interdía (Tablas XVI, XVII y XVIII) se cumplió el criterio de aceptación que establece que el %CV de la cantidad recuperada promedio durante tres días no debe ser mayor que el 15 % a cada una de las concentraciones control por lo que se confirma la reproducibilidad del método para la cuantificación de los tres analitos.

Tabla XVI. Reproducibilidad durante tres días para el alfa

		Punto bajo (0.6 µg/mL)	Punto medio (2.4 µg/mL)	Punto alto (9.6 µg/mL)
Día	No. Réplica	Concentración Recuperada (µg/mL)	Concentración Recuperada (µg/mL)	Concentración Recuperada (µg/mL)
1	1	0.6828	2.5884	9.6531
	2	0.6907	2.6421	9.8620
	3	0.7126	2.6244	9.4672
2	1	0.6055	2.4349	9.4643
	2	0.6271	2.5265	9.8215
	3	0.6136	2.5335	9.9357
3	1	0.5850	2.1664	9.1167
	2	0.5900	2.2969	8.3711
	3	0.5649	2.2413	8.7605
	Promedio	0.63	2.4	9.4
	DSTD	0.06	0.2	0.6
	%CV	9.38	8.00	5.87

Tabla XVII. Reproducibilidad durante tres días para el sulfóxido del alfa

		Punto bajo (0.6 µg/mL)	Punto medio (2.4 µg/mL)	Punto alto (9.6 µg/mL)
Día	No. Réplica	Concentración Recuperada (µg/mL)	Concentración Recuperada (µg/mL)	Concentración Recuperada (µg/mL)
1	1	0.7033	2.6212	9.8982
	2	0.7078	2.6617	10.0918
	3	0.7180	2.6447	9.7541
2	1	0.6062	2.4403	9.6494
	2	0.6188	2.5591	9.9988
	3	0.6162	2.5456	10.1070
3	1	0.6031	2.2935	9.3422
	2	0.6071	2.3396	8.6186
	3	0.5976	2.3018	9.0964
	Promedio	0.64	2.5	9.6
	DSTD	0.06	0.2	0.5
	%CV	9.17	6.70	5.39

Tabla XVIII. Reproducibilidad durante tres días para la sulfona del alfa

		Punto bajo (0.6 µg/mL)	Punto medio (2.4 µg/mL)	Punto alto (9.6 µg/mL)
Día	No. Réplica	Concentración Recuperada (µg/mL)	Concentración Recuperada (µg/mL)	Concentración Recuperada (µg/mL)
1	1	0.7302	2.6690	9.9395
	2	0.6970	2.6694	10.1674
	3	0.7012	2.6601	9.7937
2	1	0.6177	2.4641	9.7528
	2	0.6360	2.6073	9.9058
	3	0.6298	2.5619	10.2014
3	1	0.7449	2.6625	10.3881
	2	0.7450	2.7592	9.6446
	3	0.7186	2.6604	10.0168
	Promedio	0.69	2.63	9.98
	DSTD	0.06	0.08	0.03
	%CV	8.17	3.02	0.33

3.2.5 Exactitud

En las Tablas XIX XX y XXI se observa que el porcentaje de desviación absoluto está entre 2 y 15 % de la concentración nominal, lo que cumple con el criterio de aceptación.

Tabla XIX. Exactitud del método analítico para la cuantificación del alfa

	Punto bajo (0.6 µg/mL)		Punto medio (2.4 µg/mL)		Punto alto (9.6 µg/mL)	
No. Réplica	Concentración recuperada (µg/mL)	% desv absoluta	Concentración recuperada (µg/mL)	% desv absoluta	Concentración recuperada (µg/mL)	% desv absoluta
1	0.6954	15.9	2.6183	9.1	9.6608	0.6
2	0.6154	2.6	2.4983	4.1	9.7405	1.5
3	0.5799	3.3	2.2348	6.9	8.7494	8.9
Promedio	0.63	5.0	2.45	2.1	9.39	2.3

Tabla XX. Exactitud del método analítico para la cuantificación del sulfóxido del alfa

No. Réplica	Punto bajo (0.6 µg/mL)		Punto medio (2.4 µg/mL)		Punto alto(9.6 µg/mL)	
	Concentración recuperada (µg/mL)	% desv absoluta	Concentración recuperada (µg/mL)	% desv absoluta	Concentración recuperada (µg/mL)	% desv absoluta
1	0.7097	18.3	2.6425	10.1	9.9147	3.3
2	0.6137	2.3	2.5150	4.8	9.9184	3.3
3	0.6026	0.4	2.3116	3.7	9.0191	6.1
Promedio	0.64	7.1	2.49	3.7	9.62	0.18

Tabla XXI. Exactitud del método analítico para la cuantificación de la sulfona del alfa

No. Réplica	Punto bajo (0.6 µg/mL)		Punto medio (2.4 µg/mL)		Punto alto(9.6 µg/mL)	
	Concentración recuperada (µg/mL)	% desv absoluta	Concentración recuperada (µg/mL)	% desv absoluta	Concentración recuperada (µg/mL)	% desv absoluta
1	0.7095	18.2	2.6662	11.1	9.9668	3.8
2	0.6278	4.6	2.5444	6.0	9.9533	3.7
3	0.7362	22.7	2.6940	12.3	10.0165	4.3
Promedio	0.69	15.0	2.63	9.8	9.98	3.9

3.2.6 Límite de cuantificación

En la Tabla XXII se muestra la relación señal ruido (S/N) encontrada para cada uno de los analitos a la concentración de 0.2 µg/mL (concentración más baja de la curva). En ella se puede observar que para el sulfóxido y la sulfona se cumple el criterio de aceptación, $S/N \geq 5$. En el caso del compuesto alfa habría que hacer más estudios para establecer el límite de cuantificación real.

Tabla XXII. Relación señal ruido para el alfa y sus metabolitos

Replica	Respuestas Áreas		Alfa
	Sulfona	Sulfóxido	
1	40123	51309	63203
2	37439	47388	58183
3	41518	51580	63088
4	36492	47347	55232
5	40071	48594	56887
Blanco	4620	7384	12341
Relación S/N			
Replica	Sulfona	Sulfóxido	Alfa
1	8.685	6.949	5.121
2	8.104	6.418	4.715
3	8.987	6.985	5.112
4	7.899	6.412	4.475
5	8.673	6.581	4.610
Promedio	8.469	6.669	4.807

3.2.7 Estabilidad de muestra procesada

La Tabla XXIII muestra los resultados de los analitos que se mantuvieron durante 24 horas en la plataforma de inyección del cromatógrafo. Se concluye que son estables en el periodo de tiempo del ensayo.

Tabla XXIII. Estabilidad de muestra procesada para el alfa y sus metabolitos

Concentración control 0.6 µg/mL	Concentración recuperada (µg/mL)		
	0 horas	24 horas	%desvabs
Alfa	0.5711	0.5157	9.68
Sulfona	0.7362	0.701	4.77
Sulfóxido	0.6026	0.5719	5.10
Concentración control 9.6 µg/mL	Concentración recuperada (µg/mL)		
	0 horas	24 horas	%desvabs
Alfa	8.5256	7.7491	9.11
Sulfona	10.0165	9.5923	4.24
Sulfóxido	9.0191	8.3608	7.30

Con base en los resultados obtenidos se demuestra que el método es sensible, selectivo, preciso y exacto para la cuantificación del compuesto alfa, el sulfóxido y la sulfona en plasma.

3.3 Estudio farmacocinético en borregos

3.3.1 Análisis farmacocinético del sulfóxido del alfa

En las muestras de plasma analizadas de los borregos en estudio, no se detectó concentraciones del compuesto alfa. Esta observación concuerda con lo obtenido con otros bencimidazoles en los cuales el sulfóxido es el que se encuentra en mayor proporción y es el que ha demostrado actividad farmacológica³⁷, en forma análoga para este metabolito del compuesto alfa⁵⁵.

En la Tabla XXIV se muestran los resultados de concentración del sulfóxido y la sulfona del alfa, y en la Figura 9 se presenta el perfil con el promedio de las concentraciones plasmáticas vs tiempo. En ella se puede observar la gran variabilidad interindividual. El coeficiente de variación promedio en todos los niveles de concentración en los tiempos de muestreo fue de 32.4 ± 15.1 %.

Los datos se analizaron utilizando un modelo no compartimental (MNC), este modelo ofrece la ventaja de no requerir una función matemática que describa la farmacocinética del fármaco, ni de la introducción de parámetros iniciales para su modelaje.⁵⁴

Tabla XXIV. Valores promedio de la concentración plasmática del sulfóxido y la sulfona del alfa después de la administración de una dosis de 12 mg/Kg de alfa en 8 borregos

Sulfóxido				Sulfona			
Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)	DSTD*	% CV	Tiempo (h)	Concentración (µg/mL)	DSTD*	% CV
0	-	-	-	0	-	-	-
0.5	-	-	-	0.5	-	-	-
1	-	-	-	1	-	-	-
2	0.259	0.201	77.54	2	-	-	-
3	0.709	0.329	46.34	3	0.171	0.075	44.00
4	1.509	0.590	39.10	4	0.369	0.129	35.04
6	3.323	0.869	26.16	6	0.889	0.241	27.11
8	4.764	1.939	40.70	8	1.442	0.526	36.49
10	5.122	1.220	23.81	10	2.002	0.699	34.89
12	5.217	1.189	22.79	12	2.331	1.196	51.33
24	4.974	1.058	21.26	24	2.643	0.985	37.27
30	4.231	1.302	30.76	30	2.327	1.017	43.73
36	3.120	0.699	22.41	36	2.072	0.983	47.43
48	1.908	0.455	23.86	48	1.206	0.601	49.85
72	0.798	0.187	23.39	72	0.496	0.234	47.19
96	0.346	0.096	27.64	96	0.232	0.132	56.82
120	0.161	0.046	28.55	-	-	-	-

*DSTD: desviación estándar

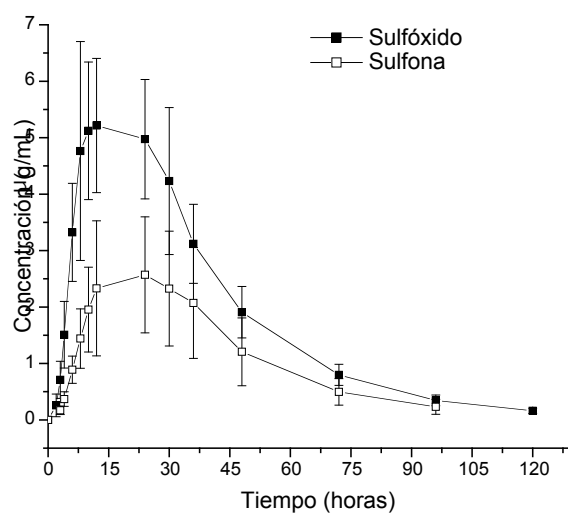
**Figura 9.** Valores promedio (\pm DSTD) de la concentración plasmática del sulfóxido y la sulfona del alfa después de la administración de una dosis de 12 mg/Kg de alfa en 8 borregos. (DSTD= desviación estándar)

Tabla XXV. Promedio de los parámetros farmacocinéticos del sulfóxido del alfa obtenidos después de la administración oral de 12 mg/Kg del alfa a 8 borregos, por el método modelo independiente

Parámetros	Promedio	DSTD	%CV
Coefficiente de correlacion	0.995	0.009	0.88
Ke(1/h)	0.035	0.002	6.17
t _{1/2} (h)	20	1	5.96
t retardo (h)	0.000	0.000	0.00
tmax (h)	14	6	45.72
Cmax (µg/mL)	5.6	0.9	23.61
ABC ^{0-t} (h*µg/mL)	228	50	22.12
ABC ^{0-inf} (h*µg/mL)	233	50	21.73
AUC% Extrap (%)	1.9	0.8	40.82
V / F (L/Kg)	1.5	0.4	24.77
Cl / F_(mL/h)	2979	710	23.84
ABMC ^{0-t} (hr*hr*µg/mL)	7637	1771	23.19
ABMC ^{0-inf} (h*h*µg/mL)	8292	1833	22.10
MRT ^{0-t} (h)	34	2	4.68
MRT ^{0-inf} (h)	36	2	6.10

DSTD desviación estándar

%CV coeficiente de variación porcentual

Ke constante de eliminación

t retardo tiempo de retardo

t max tiempo en que se alcanza la concentración plasmática máxima

c max concentración plasmática máxima

AUC^{0-t} área bajo la curva de 0 al tiempo tAUC^{0-inf} área bajo la curva de 0 a infinito (inf)AUC% Extrap (%) diferencia porcentual entre AUC^{0-inf} y AUC^{0-t}

V / F (L/Kg) volumen de distribución

Cl / F_(mL/h) aclaramiento total

ABMC^{0-t} (h*h*µg/mL) área bajo la curva la primer momento de 0 a tABMC^{0-inf} (h*h*µg/mL) área bajo la curva al primer momento de 0 a infinitoMRT^{0-t} (h) tiempo medio de residencia de 0 a tMRT^{0-inf} (h) tiempo medio de residencia de 0 a infinito

t último tiempo tomado para el análisis de los datos (120 horas)

Tabla XXVI. Promedio de los parámetros farmacocinéticos de la sulfona del alfa obtenidos después de la administración oral de 12 mg/Kg del alfa a 8 borregos

Parámetros	Promedio	DSTD	%CV
Coefficiente de correlación	0.991	0.010	1.048
Ke(1/h)	0.037	0.006	16.70
t _{1/2} (h)	19	3	17.13
t retardo (h)	0.000	0.000	0.000
tmax (h)	23	7	31.80
Cmax (µg/mL)	2.3	0.9	36.70
ABC ^{0-t} (h*µg/mL)	96	37	38.79
ABC ^{0-inf} (h*µg/mL)	101	40	39.10
AUC% Extrap (%)	5	3	51.81
V / F (L/Kg)	3.7	0.7	18.06
Cl / F ₀ (mL/h)	4	1	31.23
ABMC ^{0-t} (h*h*µg/mL)	3339	1393	41.71
ABMC ^{0-inf} (h*h*µg/mL)	4074	1814	44.51
MRT ^{0-t} (h)	35	2	6.89
MRT ^{0-inf} (h)	39	5	12.44

D.STD desviación estándar

%CV coeficiente de variación porcentual

Ke constante de eliminación

t retardo tiempo de retardo

t max tiempo en que se alcanza la concentración plasmática máxima

c max concentración plasmática máxima

AUC^{0-t} área bajo la curva de 0 al tiempo t

AUC^{0-inf} área bajo la curva de 0 a infinito (inf)

AUC% Extrap (%) diferencia porcentual entre AUC^{0-inf} y AUC^{0-t}

V / F (L/Kg) volumen de distribución

Cl / F₀ (mL/h) aclaramiento total

ABMC^{0-t} (h*h*µg/mL) área bajo la curva la primer momento de 0 a t

ABMC^{0-inf} (h*h*µg/mL) área bajo la curva al primer momento de 0 a infinito

MRT^{0-t} (h) tiempo medio de residencia de 0 a t

MRT^{0-inf} (h) tiempo medio de residencia de 0 a infinito

t último tiempo tomado para el análisis de los datos (120 horas)

En la Tabla XXV se presentan los resultados obtenidos para el sulfóxido del alfa. La vida media fue relativamente prolongada, entre 18 y 21 horas (promedio, 20 horas, %CV = 5.69%), la concentración máxima de 5.64 µg/mL se alcanza a un tiempo promedio de 14 horas (tiempo máximo, comprendido entre 8 y 24 horas); y su tiempo de residencia es de alrededor de 35 horas. Este metabolito empieza aparecer alrededor de dos horas después de administrado el fármaco.

Al comparar los resultados obtenidos con los reportados para el metabolito del triclabendazol³² se encontró: la vida media del sulfóxido del compuesto alfa es de 20 horas por lo que es mayor al correspondiente de TCBZ-SO de 16 horas; el t_{max} se alcanza a las 14 horas comparado a las 34 horas para del TCBZSO, en este último la C_{max} es de 13.1 µg/mL mientras que para el sulfóxido del alfa fue menor, 5.6 µg/mL.

Por los resultados mencionados y por la eficacia que ha demostrado en estudios recientes tanto *in vivo* como *in vitro*^{43,44,46}, además por la presencia de las cepas resistentes de fasciola hepática al triclabendazol⁴⁸ se propone como candidato terapéutico contra la fasciolosis en borregos.

3.3.2 Análisis farmacocinético de la sulfona

A pesar de que los estudios han demostrado que las sulfonas de los bencimidazoles no presentan actividad farmacológica, se ha propuesto que en algún proceso puede estar involucrado en la eficacia del sulfóxido³³, por ello se consideró importante conocer la farmacocinética del metabolito.

Los parámetros farmacocinéticos de la sulfona son similares a los del sulfóxido. El tiempo de vida media de 19 horas, un t_{max} de 23 horas y una concentración plasmática máxima de 2.36 µg/mL (Tabla XXVI). Dado que la sulfona depende de la oxidación del sulfóxido, su aparición en plasma es aproximadamente una hora después de que se ha formado el sulfóxido, lo cual es consistente con el metabolismo propuesto para los bencimidazoles.

La relación que se encuentra entre el sulfóxido y la sulfona basados en su ABC_0^{inf} corresponde a 2.3 lo que confirma que la proporción de sulfóxido formada es mayor comparada a la sulfona.

3.4 Unión a proteínas del sulfóxido del alfa

3.4.1 Determinación del sulfóxido del alfa en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4

Los resultados de linealidad del método se presentan en la Tabla XXVII y en la Figura 10. En ella se puede observar que el método es lineal en el rango de concentraciones estudiado.

Tabla XXVII. Curvas de calibración del sulfóxido del alfa en amortiguador de fosfatos, 0.067M, pH 7.4

	Recuperado			Promedio	D,STD	%CV			
Conc (µg/mL)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 1	Curva 2	Curva 3			
6	552838	561700	544456	6.15	6.14	6.23	6.18	0.04	0.72
5	434669	453471	420118	4.80	4.95	4.79	4.85	0.08	1.70
4	358153	346826	339146	3.93	3.78	3.85	3.85	0.04	1.09
3	282049	277334	263664	3.06	3.02	2.98	3.02	0.02	0.72
2	203720	193136	193025	2.16	2.09	2.16	2.14	0.04	1.69
1	94102	95764	91799	0.91	1.02	0.99	0.97	0.02	2.44
Pendiente	87503.74	90862.20	86287.03		Pendiente		88218		
Intercepto	14658.73	3354.13	6696.73		Intercepto		8236.5		
r^2	0.9940	0.9955	0.9918		r^2		0.9946		
r	0.9970	0.9977	0.9959		r		0.9973		

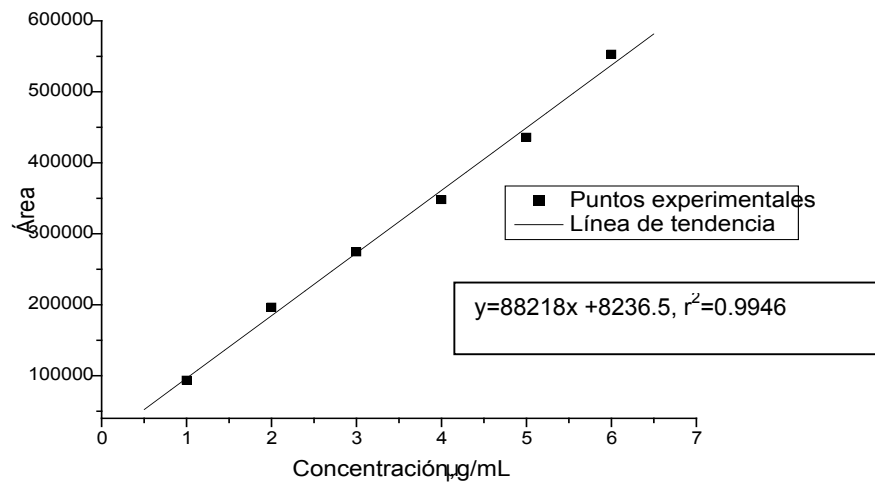


Figura 10. Curva de calibración promedio del sulfóxido del alfa en amortiguador de fosfatos, 0.067M, pH 7.4. y= áreas, x= concentración, µg/mL

3.4.2 Determinación del tiempo de equilibrio

Para realizar la unión a proteínas es necesario cuantificar el α -SO en ambos compartimentos una vez alcanzado el equilibrio entre el compartimento de plasma conteniendo el fármaco y el de amortiguador. En nuestro caso sólo se realizó la cuantificación en el compartimento del plasma. Para ello se realizó el estudio durante 8 horas a 15 rpm, tomando muestras a las 2, 4, 5, 6 y 8 horas. El tiempo de equilibrio se estableció en 6 horas, debido a que entre 5 y 8 horas el porcentaje de unión es más constante. En la Tabla XXVIII se observan los resultados.

Las concentraciones máximas en plasma de borrego del sulfóxido se encuentran entre 4 y 8 µg/mL, por lo que 6.4 µg/mL representa la media, de ahí que se utilizó esta concentración para evaluar el grado de unión de proteínas. La concentración más alta se seleccionó para determinar si existe algún proceso de saturación del fármaco a las proteínas plasmática.

Tabla XXVIII. Grado de unión a proteínas totales del sulfóxido del alfa para establecer el tiempo de equilibrio

Tiempo	Concentración de α -SO ($\mu\text{g/mL}$)	% de α -SO unido
2 horas	3.954	103.843
4 horas	3.737	98.272
5 horas	3.639	95.480
6 horas	3.545	92.755
8 horas	3.689	96.942
Control 12.8 $\mu\text{g/mL}$ 0.5 mL, α -SO	3.802	

El grado de unión a proteínas totales a las dos concentraciones de sulfóxido del alfa; 12.8 y 6.4 $\mu\text{g/mL}$, fue de 86.17 y 82.77 %. Se observa que en ambas concentraciones la unión es similar, lo cual podría indicar que a estas concentraciones aún no se ha llegado a la saturación de las proteínas.

Existe reportes en la literatura indicando que el sulfóxido del triclabendazol se une en un 90 % a proteínas plasmáticas.³³ Al comparar nuestros resultados se observa que ambos compuestos presentan un alto grado de unión.

4. Conclusiones

- El método analítico para la cuantificación del alfa y sus metabolitos cumplió satisfactoriamente con los criterios de aceptación para especificidad, linealidad, precisión y exactitud en el intervalo de concentración de 0.2 a 12.8 $\mu\text{g/mL}$, por lo que a futuro puede ser utilizado en estudios biofarmacéuticos o farmacocinéticos en otras especies animales.
- En borregos el compuesto alfa se metaboliza completamente al sulfóxido y la sulfona del alfa
- El sulfóxido y la sulfona presentaron un tiempo prolongado de permanencia en el organismo.
- El porcentaje de unión a proteínas encontrada para el sulfóxido del alfa es alto lo que va en relación a la vida media y tiempo medio de residencia.
- El compuesto alfa es un buen candidato para ser utilizado como agente fasciolicida.

5. Bibliografía

1. Soulsby E.J.L. 1987. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. Nueva Editorial Interamericana. México, pp. 37-49
2. Quiroz, RH. 1990. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. Limusa. México, pp.232-251
3. Atías, A. 1996. *Parasitología Médica*. Mediterraneo, Chile, pp. 374-382
4. Richards R.J., Bowen F.L., Essenwein F., Steiger R.F., Buscher G. 1990. The efficacy of triclabendazole and other anthelmintics against *Fasciola hepatica* in controlled studies in cattle. *The Veterinary Record*, 126: 213-216.
5. Ach, B. 1986. Fascioliasis en Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. Publicación científica 503, segunda edición. Organización Panamericana de la Salud, Washington, D.C., Estados Unidos de América, pp. 689-696
6. Sanyal P.K. 1994. Pharmacokinetic behavior of febendazole in buffalo and cattle. *Journal of Veterinary of Pharmacology and Therapeutics*, 17: 1-4
7. Organización Panamericana de la Salud. Organización Mundial de la Salud. XII Reunión Interamericana a Nivel Ministerial en Salud y Agricultura *São Paulo, Brasil, 2 al 4 de mayo de 2001*
8. Yilmaza H., Gödekmerdanb A. 2004. Short communication: Human fasciolosis in Van province, Turkey. *Acta Tropica*, 92: 161–162
9. Okevole E.A., Ogundipe G.A.T., Adejinmi J.O. & Olaniyan A.O. 2000. Clinical Evaluation of three Chemoprophylactic Regimes Against Ovine Helminthosis in a Fasciola-Endemic Farma in Ibadan, Nigeria. *Israel Journal of Veterinary*, 56: 1-10
10. Litter, M. *Farmacología, experimental y clínica*, 7ª edición. Editorial El Ateneo. Buenos Aires, 1991, pp. 1715-1716
11. Alcalá Y., Ibarra F., García J., Sumano, H. 2005. Fasciola hepatica proteolytic activity in liver revealed by in situ zymography. *Parasitology Research*, 96: 308-311

12. Cho S.Y., Yang H.N., Kong Y., Kim J.C., Shim K.W., Koo B.S. 1994. Intraocular Fasciolosis: a case report. *American Journal Tropical Medical Higiene*, 50: 349-353
13. Dalami A., Jabarvand M. 2005. Fasciola hepatica in the human eye. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 99: 798- 800.
14. WHO. 1998. Triclabendazole in the treatment of established human fascioliasis *Eastern Mediterranean Health Journal*, 4: 244-251
15. Ashrafi K., Valero M.A., Panova M., Periago M.V., Massoud J., Mas-Coma S. 2006. Phenotypic analysis of adults of Fasciola hepatica, Fasciola gigantica and intermediate forms from the endemic region of Gilan, Iran *Parasitology International*, 55: 249–260
16. Curtalea F., Hassaneinb Y.A.W., Barduagnia P., Mostafa M., El Wakeelc A., Hallaj Z., Mas-Coma S. 2007. Human fascioliasis infection: gender differences within school-age children from endemic areas of the Nile Delta, Egypt *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 101: 155-160
17. Mas-Coma S., Bargues M.D., Valero M.A. 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 35: 1255-1278
18. Macpherson C.N.L. 2005. Review: Human behaviour and the epidemiology of parasitic zoonoses. *International Journal for Parasitology*, 35: 1319-1331
19. Richards R.J., Bowen F.L., Essenwein F., Steiger R.F., Büscher G. 1990. The efficacy of triclabendazole and other anthelmintics against Fasciola hepatica in controlled studies in cattle. *The Veterinary Record*, 126: 213-216
20. Rapic D., Dzakula N., Sakar D., Richards R.J. 1988. Comparative efficacy of triclabendazole, nitroxynil and rafoxanide against immature and mature Fasciola hepatica in naturally infected cattle. *The Veterinary Record*, 122: 59-62.
21. Turner K., Armour J., Richards R.J. 1984. Anthelmintic efficacy of triclabendazole against Fasciola hepatica in sheep. *The Veterinary Record*, 114: 41-42
22. Wolff K., Eckert J., Schneiter G., Lutz H. 1983. Efficacy of triclabendazole against Fasciola Hepatica in sheep and goats. *Veterinary Parasitology*, 13: 145-150

23. Fawcett, A. 1990. A study of a restricted programme of strategic dosing against *Fasciola hepatica* with triclabendazole. *The Veterinary Record*, 127: 492-493
24. Boray J.C., Crowfoot P.D., Strong M.B., Allison J.R., Schellenbaum M., Von Orelli M., Sarasin G. 1983. Treatment of immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep with triclabendazole. *The Veterinary Record*, 113: 315-317
25. Büscher G., Bowen F.L., Strong M.B., Allison J.R., Richards R.J. 1987. Extension of the prepatent period of *Fasciola hepatica* in infected animals following treatment with triclabendazole. *The Veterinary Record*, 120: 460-460
26. Kinabo L., Bogan J.A. 1988. Pharmacokinetics and efficacy of triclabendazole in goats with induced fascioliasis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 11: 254-259
27. Sanyal P.K., Gupta S. 1996. The efficacy and pharmacokinetics of long-term low level intraruminal administration of triclabendazole in buffalo with induced fasciolosis. *Veterinary Research Communications*, 28: 461-468
28. Sanyal P.K., Gupt S.C. (1996). Efficacy and pharmacokinetics of triclabendazole en buffalo with induced fasciolosis, *Veterinary Parasitology*. 63: 75-82
29. Rubilar L., Cabreira A., Giacaman L. 1988. Treatment of *Fasciola hepatica* infection in horses with triclabendazole. *The Veterinary Record*, 123: 320-321
30. Kinabo L.B.D., Bogan, J.A. 1989. Disposition of triclabendazole in horses, ponies and donkeys. *Equine Veterinary Journal*, 21: 305-307
31. Mottier L., Virkel G., Solana H., Álvarez L., Salles J., Lanusse C. 2004. Triclabendazole biotransformation and comparative diffusion of the parent drug and its oxidized metabolites into *Fasciola hepatica*. *Xenobiotica*, 34:1043-1057
32. Hennessy D., Lacey E., Steel J., Prichard R. 1987. The kinetics of triclabendazole disposition in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10: 64-72
33. Virkel G., Lifschitz A., Sallovitz J., Pis A., Lanusse C. 2006. Assessment of the main metabolism pathways for the flukicidal compound triclabendazole in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 29: 213-223,
34. Lacey, E. 1990. Mode of Action of Benzimidazoles. *Parasitology Today*, 4; 112-115.

35. Mottier L., Alvarez L., Ceballos L., Lanusse C. 2006. Drug transport mechanisms in helminth parasites: Passive diffusion of benzimidazole anthelmintics. *Experimental Parasitology*, 113: 49-57
36. Brennan G.P., Fairweather I., Trudgett A., Hoey E., McConville M., Meaney , Robinson M., McFerran N., Ryan L., Lanusse C., Mottier L., Alvarez L., Solana H., Virkel G., Brophy P.M. 2007. Understanding triclabendazole resistance *Experimental and Molecular Pathology*, 82: 104–109
37. Stitt A.W., Fairweather I. 1993. Fasciola hepatica: tegumental surface changes in adult and juvenile flukes following treatment *in vitro* with the sulphoxide metabolite of triclabendazole (Fasinex), *Parasitology Research*, 79: 529-536
38. Álvarez M.A., Mainar-Jaime R.C., Pérez J., Rojo F.A. 2006. Resistance of Fasciola hepatica to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *The Veterinary Record*, 159: 424-425
39. Robinson M.W., Lawson J., Trudgett A., Hoey E., Fairweather I. 2004. The comparative metabolism of triclabendazole sulphoxide by triclabendazole-susceptible and triclabendazole-resistant Fasciola hepatica. *Parasitology Research*, 92: 205-210
40. Robinson M.W., Hoey E.M., Fairweather I., Dalton J.P., McGonigle S., Trudgett A. 2001. Characterisation of a beta-tubulina gene from the liver fluke, Fasciola hepatica. *International Journal for Parasitology*, 31: 1264-1268
41. McKellar Q.A., Scout, E.W. 1990. The benzimidazole anthelmintic agents-a review *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 13: 223-247
42. Bennet J.L., Köhler P. 1987. Fasciola hepatica: Action *in vitro* of triclabendazole on immature and adult stages. *Experimental Parasitology*, 63: 49-57
43. Ibarra F., García E., Hernández M., Vera Y., Castillo R., Hernández A. 1997. Eficacia fasciolicida de dos compuestos de síntesis química *in vitro* e *in vivo* en ovinos. *Veterinaria México*, 28: 291-296
44. Ibarra F., Montenegro Y., Hernández A., Castillo R. 1997. Eficacia fasciolicida del compuesto "alfa" contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Veterinaria México*, 28: 1297-301

45. Ibarra F., Montenegro N., Flores J., Hernández A., Castillo R. 1999. Evaluación de cuatro vehiculos para formular un fasciolicida experimental. *Veterinaria México*, 31: 1-7
46. Rivera N., Ibarra F., Olazarán S., Montenegro Y., Castillo R., Hernández A. 2002. Eficacia del 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-ih-bencimidazol contra diversas edades de *Fasciola hepatica* en ovinos *Pelibuey*. *Veterinaria México*, 33: 51-62
47. Rivera N., Ibarra F., Zepeda A., Fortoul T., Canto G., A. Hernández, Castillo R. 2005. The effect of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphtyloxy)- 1*H*-benzimidazole on the tegument of immature *Fasciola hepatica* in their natural host. *Parasitology Research*, 95: 379–382
48. McConville M. 2004. Evaluation of a novel benzimidazole compound against triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. BSc (hons), School of Biology and Biochemistry, Quenn's University of Belfast, Belfast
49. Food and Drug Administrarion (FDA). 2001. *Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation*
50. Secretaría de Salud Norma Oficial Mexicana Mexicana NOM-177-SSA1-Diario Oficial. 1998. México, pp 44-67
51. Pacifici M., Viani A. 1992. Methods of determining plasma and tissue binding of drugs. *Clinical Pharmacokinetics*, 23: 449-468
52. Fois R., Ashley J. 1991. Drug binding to apparatus: a factor controlling time to equilibrium in equilibrium dialysis studies. *Journal Pharmaceutical Science*, 80: 300-302
53. Del Rivero L.M., Jung H., Castillo R., Hernández A. 1998. High-perfomance liquid chromatographic assay for a new fasciolicide agent, α BIOF10, in biological fluids. *Journal of Chromatography B*, 712: 237-241
54. Shargel L., Wu-Pong S., Yu A. 2005. *Applied Biopharmaceutics and Pharmacokinetics*, 5ta ed. McGrawHill, USA, pp. 143-144
55. Rivera N., Ibarra F., Zepeda A., Fortoul T., Hernández A., Castillo R., Canto G. 2004. Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment in vitro and in vivo with an experimental fasciolicide. *Parasitology Research*, 93: 283–286

6. Apéndice

6.1 Apéndice A. Concentraciones plasmáticas en $\mu\text{g/mL}$ del sulfóxido del alfa a los diferentes tiempos de muestreo encontrados en borregos *Pelibuey* (n=8)

Tiempos (horas)	Borregos								Promedio	DSTD	%CV
	1	2	3	4	5	6	7	8			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0.132	0.470	0.179	0.095	0.119	0	0	0.555	0.259	0.201	77.543
3	0.558	0.899	0.690	0.537	0.531	0.613	0.407	1.440	0.709	0.329	46.338
4	1.038	2.035	1.452	1.144	1.128	1.167	P	2.601	1.509	0.590	39.104
6	2.930	4.128	3.372	3.510	2.887	2.627	2.212	4.917	3.323	0.869	26.161
8	3.159	5.353	8.307	5.435	4.167	2.535	2.997	6.159	4.764	1.939	40.704
10	4.897	5.498	7.305	5.617	P	4.512	3.346	4.677	5.122	1.220	23.814
12	5.022	6.024	7.046	6.225	4.071	4.737	3.402	5.207	5.217	1.189	22.788
24	3.855	5.668	6.611	5.063	4.297	3.813	4.390	6.098	4.974	1.058	21.265
30	3.235	5.595	4.757	5.166	4.271	1.905	3.379	5.543	4.231	1.302	30.758
36	2.317	3.930	4.083	3.452	3.061	2.310	2.497	3.308	3.120	0.699	22.409
48	1.205	2.364	2.485	2.036	1.824	1.322	1.902	2.130	1.908	0.455	23.855
72	0.578	1.099	0.971	0.882	0.815	0.558	0.700	0.781	0.798	0.187	23.392
96	0.256	0.513	0.433	0.325	0.371	0.231	0.271	0.368	0.346	0.096	27.642
120	0.115	0.223	0.189	0.128	0.140	0.116	0.226	0.148	0.161	0.046	28.546

P: muestra perdida

6.2 Apéndice B. Concentraciones plasmáticas en $\mu\text{g/mL}$ de la sulfona del alfa a los diferentes tiempos de muestreo encontrados en borregos *Pelibuey* (n=8)

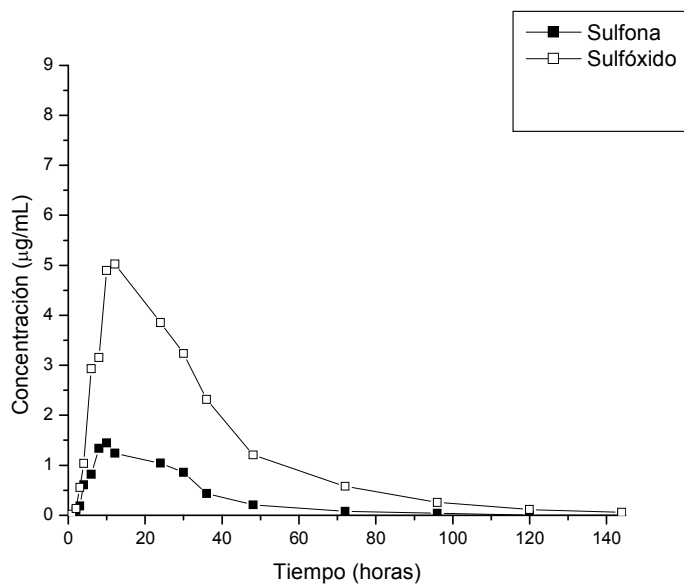
Tiempos (horas)	Borrego								Promedio	DSTD	%CV
	1	2	3	4	5	6	7	8			
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0.096	0.225	0.233	0.189	0.102	0.112	0.099	0.309	0.171	0.080	47.043
4	0.186	0.490	0.405	0.414	0.276	0.243	P	0.571	0.369	0.140	37.846
6	0.607	1.158	0.905	1.218	0.712	0.661	0.681	1.168	0.889	0.258	28.979
8	0.818	1.800	1.671	2.352	1.241	0.764	1.047	1.842	1.442	0.562	39.006
10	1.339	2.267	2.869	3.125	P	1.419	1.010	1.650	1.954	0.812	41.540
12	1.448	2.648	2.674	5.223	1.573	1.543	1.409	2.127	2.331	1.279	54.875
24	1.241	3.146	3.595	4.190	1.839	1.580	1.733	3.241	2.571	1.098	42.712
30	1.043	3.462	3.210	3.315	1.844	0.832	1.716	3.190	2.327	1.088	46.750
36	0.856	2.882	2.557	4.010	1.573	1.097	1.445	2.155	2.072	1.050	50.701
48	0.433	1.672	1.612	2.313	0.871	0.471	1.021	1.259	1.206	0.643	53.292
72	0.206	0.702	0.812	0.807	0.421	0.222	0.308	0.492	0.496	0.250	50.449
96	0.080	0.452	0.414	0.268	0.196	0.072	0.153	0.222	0.232	0.141	60.744
120	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
144	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

P: muestra perdida

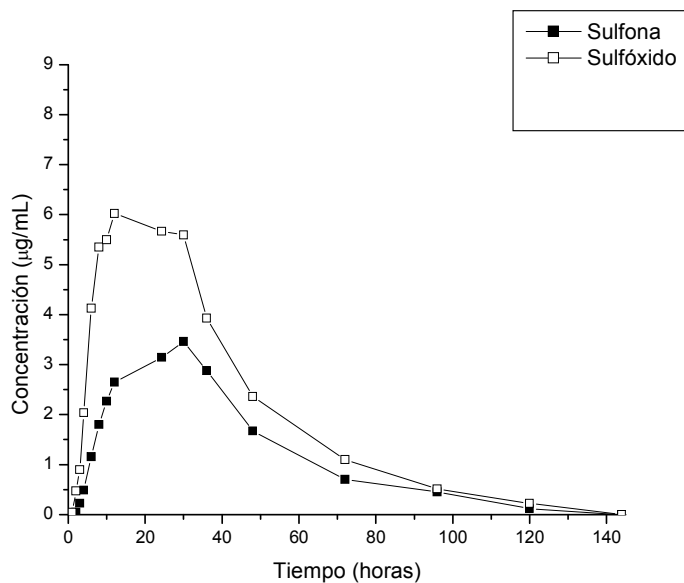
*muestras no tomadas en cuenta por presentar concentraciones menores a $0.1 \mu\text{g/mL}$

6.3 Apéndice C. Perfiles farmacocinéticos del sulfóxido y la sulfona después de la administración de una dosis de 12 mg/kg del compuesto alfa en plasma de borregos *Pelibuey*(n=8)

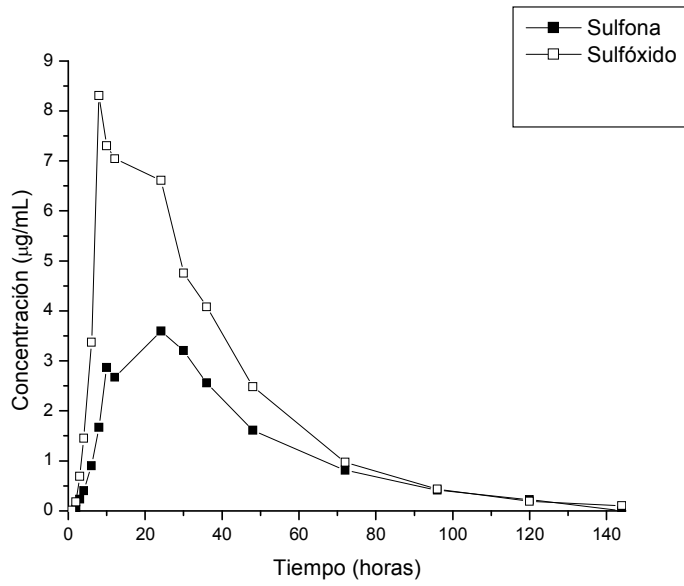
Borrego 1



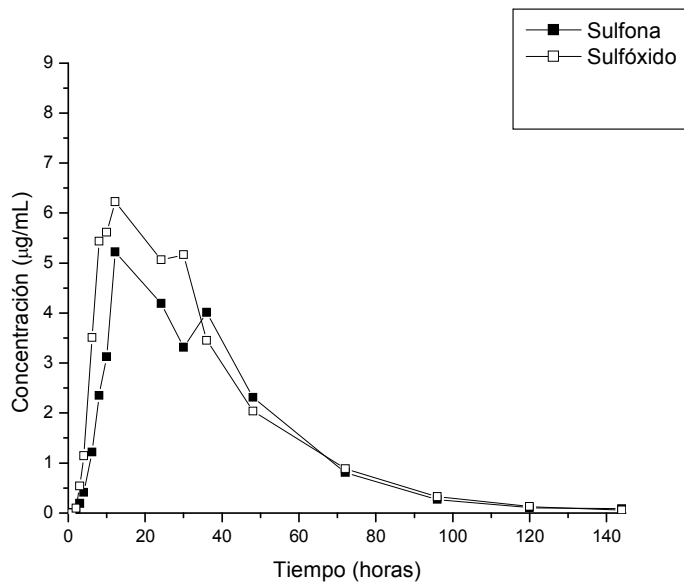
Borrego 2



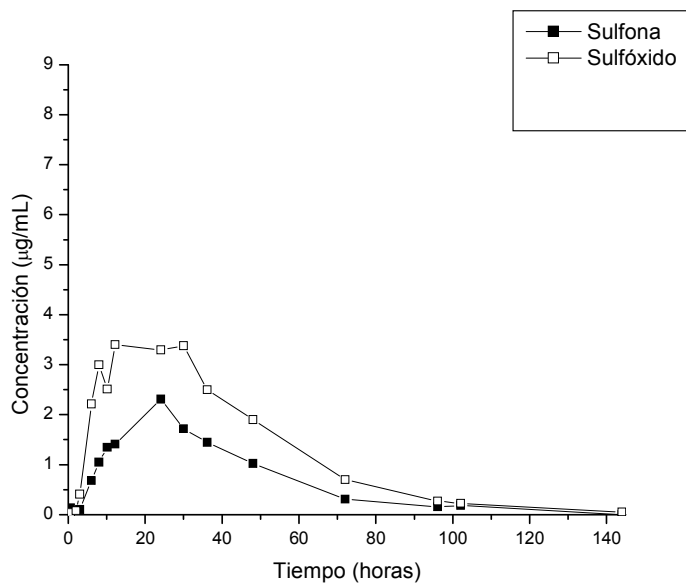
Borrego 3



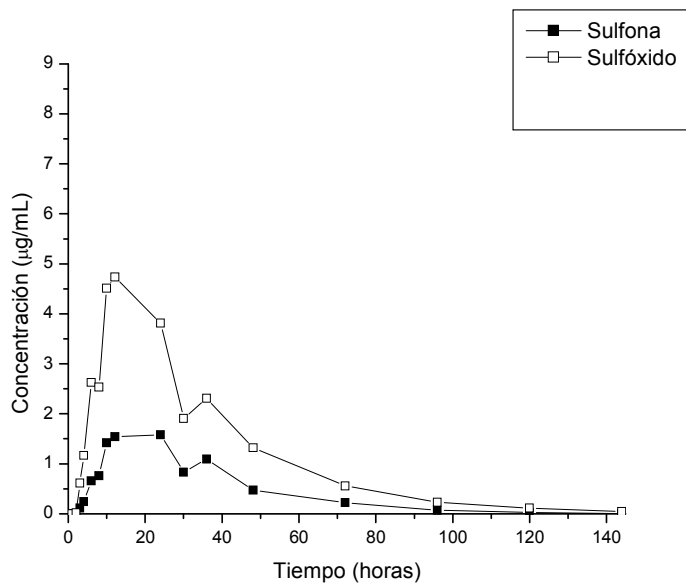
Borrego4



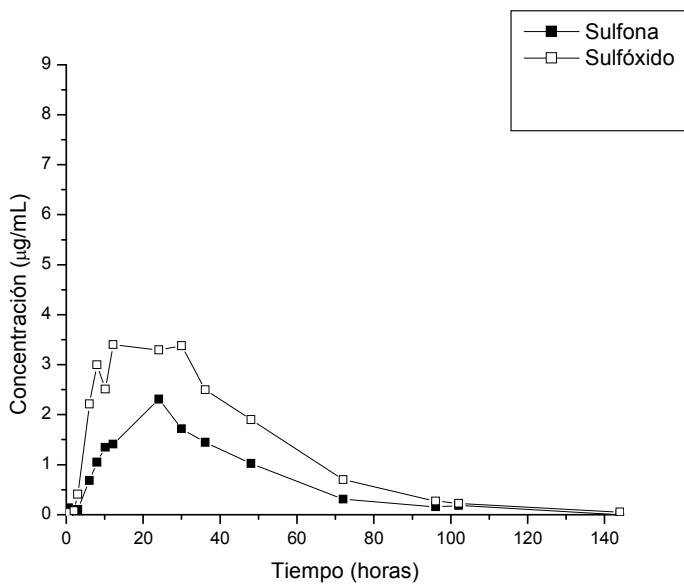
Borrego 5



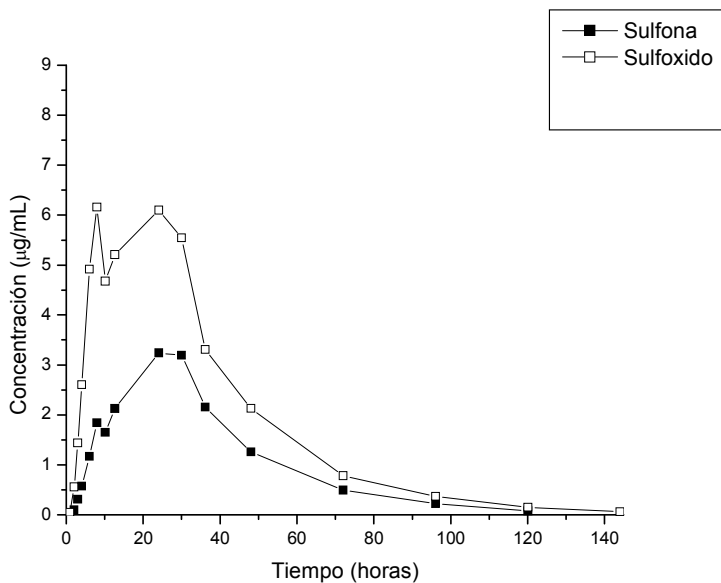
Borrego 6



Borrego 7



Borrego 8



Apéndice

6.4 Apéndice D. Parámetros farmacocinéticos del sulfóxido después de la administración de una suspensión del alfa a una dosis de 12 mg/Kg a 8 borregos *Pelibuey*

Borrego	Coefficiente de correlacion	Ke (1/h)	t _{1/2} (h)	t lag retardo (h)	tmax (h)	Cmax (µg/mL)	ABC ^{0-t} (h*µg/mL)	ABC ^{0-inf} (h*µg/mL)	AUC% Extrap (%)	V / F (L/Kg)	Cl / F (mL/h)	ABMC ^{0-t} (h*h*µg/mL)	ABMC ^{0-inf} (hr*hr*µg/mL)	MRT ^{0-t} (h)	MRT ^{0-inf} (h)
1	1	0.034	20.543	0	12.133	5.022	177.639	181.034	1.875	1.965	3645.728	5582.395	6090.497	31.426	33.643
2	0.9996	0.033	21.202	0	12.033	6.024	280.692	287.508	2.371	1.277	2128.637	9717.185	10743.690	34.619	37.368
3	0.9956	0.035	19.775	0	7.983	8.307	299.627	302.613	0.987	1.131	2200.835	10089.883	10605.014	33.675	35.045
4	0.9993	0.039	17.779	0	12.167	6.226	249.736	253.021	1.298	1.216	2798.192	8142.265	8620.721	32.604	34.071
5	0.9981	0.036	19.289	0	24.117	4.297	208.359	212.261	1.838	1.573	2770.171	7280.571	7857.450	34.942	37.018
6	0.997	0.034	20.323	0	12.217	4.737	166.343	169.740	2.001	2.073	4206.430	5303.085	5810.509	31.880	34.232
7	0.9739	0.033	21.118	0	24.117	4.390	185.851	192.737	3.573	1.897	3330.967	6616.442	7653.298	35.601	39.709
8	0.9981	0.037	18.821	0	8.000	6.159	259.750	263.777	1.527	1.235	2752.326	8363.141	8956.159	32.197	33.954
Promedio	0.995	0.035	19.856		14.096	5.645	228.500	232.836	1.934	1.546	2979.161	7636.871	8292.167	33.368	35.630
DSTD	0.009	0.002	1.184		6.444	1.333	50.548	50.594	0.789	0.383	710.265	1771.340	1832.686	1.561	2.173
%CV	0.877	6.172	5.962		45.719	23.612	22.122	21.729	40.819	24.768	23.841	23.195	22.101	4.679	6.100

Apéndice

6.5 Apéndice E. Parámetros farmacocinéticos de la sulfona después de la administración de una suspensión del alfa a una dosis de 12 mg/Kg a 8 borregos *Pelibuey*

Borrego	Coefficiente de correlacion	Ke(1/h)	t _{1/2} (h)	t lag retardo (h)	Tmax (h)	Cmax (µg/mL)	ABC ^{0-t} (h*µg/mL)	ABC ^{0-inf} (h*µg/mL)	AUC% Extrap (%)	V / F (L/Kg)	Cl / F_(mL/h)	ABMC ^{0-t} (h*h*µg/mL)	ABMC ^{0-inf} (h*h*µg/mL)	MRT ^{0-t} (h)	MRT ^{0-inf} (h)
1	0.9949	0.0384	18.066	0	12.133	1.448	55.019	57.112	3.665	5.476	11556.242	1729.313	1984.852	31.431	34.754
2	0.972	0.0286	24.222	0	29.983	2.667	122.725	137.521	10.759	3.049	4450.222	4665.632	6602.892	38.017	48.014
3	0.9994	0.0304	22.816	0	24.133	2.611	110.974	119.716	7.303	3.299	5563.155	4069.178	5196.253	36.668	43.405
4	1	0.0422	16.410	0	12.167	4.055	165.146	170.873	3.352	1.663	4143.428	5689.777	6375.128	34.453	37.309
5	0.9998	0.031	22.324	0	30.017	1.844	88.267	94.595	6.690	4.086	6215.955	3143.313	3954.725	35.611	41.807
6	0.9843	0.0432	16.052	0	24.133	1.580	60.862	62.522	2.656	4.445	11419.932	1904.343	2102.307	31.290	33.625
7	0.9822	0.0353	19.623	0	24.117	1.801	65.698	69.932	6.056	4.858	9180.294	2313.693	2840.403	35.217	40.616
8	0.9962	0.0435	15.921	0	30.017	2.524	95.444	98.316	2.922	2.804	7384.348	3196.424	3538.451	33.490	35.991
Promedio		0.037	19.429		23.337	2.316	95.517	101.324	5.425	3.710	7489.197	3338.959	4074.376	34.522	39.440
DSTD		0.006	3.328		7.422	0.850	37.053	39.615	2.811	1.238	2942.852	1392.761	1813.633	2.377	4.905
%CV		16.703	17.131		31.802	36.704	38.792	39.098	51.812	33.383	39.295	41.712	44.513	6.886	12.437

Apéndice

6.6 Apéndice F. Cromatograma ampliado del blanco de plasma

