



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Evaluación biofarmacéutica de nuevos derivados
[1*H*-bencimidazol-5(6)-il]carboxamidas con actividad
antihelmíntica.

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA



TUTOR: **DRA. HELGI JUNG COOK**

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.

Evaluación biofarmacéutica de nuevos derivados
[1*H*-bencimidazol-5(6)-il]carboxamidas con actividad
antihelmíntica.

Agradecimientos

El estudio farmacocinético y la parte analítica del presente trabajo, se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Biofarmacia del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, ubicado en el Edificio E, bajo la dirección de la Dra. Helgi Jung Cook.

Las actividades de los estudios de permeabilidad se llevaron a cabo en las instalaciones de la Unidad de Investigación en Enfermedades Parasitarias del Hospital de Pediatría ubicado en el Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, bajo la dirección de la Dra. Lilián Yépez Mulia.

Este trabajo se desarrolló con el apoyo económico de los siguientes proyectos:

Proyecto 43629 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Proyecto FOFOI 2004/133 en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

El sustentante Julio César Rivera Leyva agradece el apoyo económico recibido del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) mediante la beca 159456, asignada durante el periodo comprendido entre agosto del 2001 a julio de 2005.

Este trabajo se presentó en la modalidad de cartel en:

El XXXVII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas en Acapulco, Gro., en noviembre de 2004.

El XIX Congreso de la Federación Panamericana de Farmacia en la Cd. de México, D.F. en noviembre de 2006.

Agradezco el apoyo recibido por la Dra. Helgi Jung Cook, quién me ayudo a crecer como persona y como profesional.

También, como persona y como individuo, debo reconocer y agradecer el apoyo incondicional de la Dra. Lilián Yépez Mulia, quién me otorgó un lugar dentro de su equipo de trabajo.

Un reconocimiento a mi Familia, quién más que apoyo, me brindaron un lugar donde refugiarme con mis penas y expresar mis alegrías. Gracias a todos mis hermanos y a mi Madre.

No es posible dejar a un lado a las gentes con quienes conviví tanto en el Laboratorio de Parasitología en el Centro Médico y en el Laboratorio de Biofarmacia y que en su momento también me apoyaron en diferentes actividades.

Un agradecimiento especial a los doctores Rafael Castillo, Francisco Hernández Luis y la maestra Alicia Hernández y a los integrantes del Laboratorio 122 en la Facultad de Química, ya que son parte del grupo que contribuyó a mi total formación profesional.

A todos ellos y a quienes, por falta de espacio en esta hoja no puedo citar, pero que contribuyeron a mi formación como Doctor en Ciencias Químicas, solo puedo decirle

INDICE

Capítulo	Pág.
Índice general	I
Índice de tablas	III
Índice de figuras	V
Resumen	VI
Abstract	VII
1. Introducción	1
2. Antecedentes	4
2.1 Infecciones sistémicas por helmintos	5
2.2 Las infecciones sistémicas	6
2.3 Tratamiento de infecciones helmínticas	8
2.4 Mecanismo de acción de los fármacos antiparasitarios	9
2.5 Toxicidad de los bencimidazoles	12
2.6 Los bencimidazoles como alternativas para el tratamiento de parásitos helmintos	14
2.7 Propiedades fisicoquímicas de los bencimidazoles	16
2.8 Transporte activo de bencimidazoles	19
2.9 Farmacocinética de los bencimidazoles	19
2.10 Factores que afectan la biodisponibilidad (BD) de los bencimidazoles	23
2.11 Evaluación de las propiedades biofarmacéuticas de nuevos compuestos con actividad antihelmíntica	24
3. Justificación del trabajo	26
4. Hipótesis	29
5. Objetivo general	31
5.1 Objetivos específicos	33
6. Parte experimental	35
6.1 Materiales y equipos	36
6.1.1 Estudios <i>in vitro</i>	36
6.1.1.1 Compuestos evaluados	36
6.1.1.2 Metodología analítica para la cuantificación de los compuestos 1-4 , y de los fármacos ABZ, atenolol y propranolol en solución salina de Hank's	36
6.1.1.3 Pruebas de Solubilidad	37
6.1.1.4 Determinación de pKa	37
6.1.1.5 Determinación del coeficiente de partición (Log P)	38
6.1.1.6 Determinación de la permeabilidad utilizando las líneas celulares Caco-2 y Madin Darby Canine Kidney (MDCK)	38
6.1.2 Estudios <i>in vivo</i>	39
6.2 Preparación de soluciones	40
6.2.1 Estudios <i>in vitro</i>	40
6.2.1.1 Metodología analítica para la cuantificación de los compuestos 1 , y los fármacos ABZ, atenolol y propranolol y en solución salina de Hank's	40
6.2.1.2 Pruebas de Solubilidad	41
6.2.1.3 Determinación de pKa	42
6.2.1.4 Determinación del Coeficiente de partición (Log P)	43
6.2.1.5 Determinación de la permeabilidad utilizando las líneas celulares Caco-2 y Madin Darby Canine Kidney (MDCK).	43
6.2.2 Estudios <i>in vivo</i> : farmacocinética del compuesto 1 en ratones Balb/C	44
6.3 Metodología	45
6.3.1 Estudios <i>in vitro</i>	45
6.3.1.1 Método analítico para la cuantificación de los compuestos 1-4 , y	45

los fármacos ABZ, atenolol y propranolol en solución salina de Hank's	
6.3.2 Validación de la metodología analítica	47
6.3.3 Determinación de la solubilidad	50
6.3.4 Determinación de pK_a	50
6.3.5 Determinación del coeficiente de partición (Log P) y cálculo de CLog P	51
6.3.6 Evaluación de la permeabilidad relativa de los compuestos utilizando las líneas celulares Caco-2 y Madin Darby Canine Kidney (MDCK)	52
6.4 Estudio <i>in vivo</i>	54
6.4.1 Estudio farmacocinético del compuesto 1 en ratones Balb/C	54
6.4.1.1 Método de cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos sulfóxido y sulfona en plasma de ratón	54
6.4.1.2 Método de extracción	55
6.4.1.3 Condiciones cromatográficas	55
6.4.1.4 Validación del método de cuantificación en plasma humano	55
6.4.1.5 Validación parcial del método de cuantificación del compuesto 1 en plasma de ratón	55
6.4.2 Protocolo del estudio farmacocinético del compuesto 1 en ratones Balb/c	55
6.4.2.1 Estudio Preliminar	55
6.4.2.2 Administración de la solución del compuesto 1	56
6.4.3 Estudio farmacocinético final	56
6.4.3.1 Administración de compuesto 1	56
6.4.3.2 Administración de compuesto 5	56
7. Resultados	57
7.1 Métodos <i>in vitro</i>	58
7.1.1 Validación de los métodos de cuantificación de los compuestos 1-4 y de los fármacos atenolol, propranolol y ABZ en solución de Hank's	58
7.2 Solubilidad	67
7.3 Determinación del pK_a	68
7.4 Determinación del coeficiente de partición (Log P).	68
7.5 Determinación del coeficiente de permeabilidad (Papp) en las líneas celulares Caco 2 y MDCK.	70
7.6. Estudios <i>in vivo</i>	74
7.6.1 Validación del método para cuantificación del compuesto 1 y sus metabolitos compuesto 5 y compuesto 6 en plasma humano y de ratón	74
7.7 Estudio farmacocinético preliminar del compuesto 1 en ratones Balb/C.	85
7.8 Estudio farmacocinético final en ratones Balb/C.	87
7.10 Administración de compuesto 5 en ratones Balb/C	89
8. Discusión de resultados	91
9. Conclusiones	100
10. Perspectivas	102
11. Bibliografía	104

INDICE DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Prevalencia de parasitosis a nivel mundial	5
2	Frecuencia de Helminosis intestinales en México	6
3	Fármacos utilizados para el tratamiento de helmintosis que afectan al humano a nivel sistémico	10
4	Propiedades fisicoquímicas de algunos derivados bencimidazólicos con actividad antihelmíntica	17
5	Coefficiente de partición (Log P) de derivados bencimidazólicos con actividad antihelmíntica	18
6	Derivados [<i>1H</i> -bencimidazol-5(6)-il]carboxamida evaluados	28
7	Fase móvil utilizada para la cuantificación de los compuestos evaluados	45
8	Curva de calibración para la cuantificación para los compuestos 1-4 , atenolol y propranolol	45
9	Curva de calibración para la cuantificación para ABZ	46
10	Condiciones cromatográficas para la cuantificación de los compuestos evaluados en los estudios de permeabilidad	46
11	Secuencia de inyecciones para evaluar la Selectividad de los métodos de cuantificación	48
12	Curvas de cuantificación del compuesto 1 y sus metabolitos compuesto 5 y compuesto 6	54
13	Preparación de la curva para cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos compuesto 5 y compuesto 6	54
14	Tiempos de retención de los compuestos evaluados	58
15	Intervalos de cuantificación para los compuestos analizados	65
16	Repetibilidad de los métodos utilizados para la cuantificación de los compuestos bajo estudio	65
17	Reproducibilidad de los métodos utilizados para la cuantificación de los compuestos bajo estudio	66
18	Exactitud del método de cuantificación para cada compuesto	66
19	Límite de cuantificación para los métodos evaluados	67
20	Solubilidad de los nuevos compuestos a 25 °C	67
21	Solubilidad de los compuestos 1-4 y ABZ en agua a 25 °C	68
22	Valores de pKa determinados con el software pHab y Origin	68
23	Valores de Log P y Clog P de cada uno de los compuestos evaluados	68
24	Permeabilidad y relación B-A/A-B para el transporte de los compuestos evaluados en las líneas celulares Caco-2 y MDCK	70
25	% de Recobro del compuesto 1 y sus principales metabolitos compuesto 5 y compuesto 6	78
26	Repetibilidad del método de cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos sulfóxido y sulfona en plasma humano	79
27	Reproducibilidad del método de cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos sulfóxido y sulfona en plasma humano	79
28	Exactitud del método de cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos compuesto 5 y compuesto 6	80
29	Límite de cuantificación del método de cuantificación simultánea para el compuesto 1 y sus metabolitos en plasma humano	80
30 (a)	Estabilidad del compuesto 1 y sus metabolitos a temperatura ambiente	81

30 (b)	Estabilidad del compuesto 1 y sus metabolitos en ciclos congelación/descongelación	81
30 (c)	Estabilidad del compuesto 1 y sus metabolitos en refrigeración (4 °C)	82
30 (d)	Estabilidad del compuesto 1 y sus metabolitos en congelación (-20 °C)	82
31	Repetibilidad del método de cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos compuesto 5 y compuesto 6 en plasma de ratón	83
32	Reproducibilidad del método de cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos compuesto 5 y compuesto 6 en plasma de ratón	83
33	Exactitud del método de cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos compuesto 5 y compuesto 6 (% de recobro) en plasma de ratón	83
34	Parámetros de regresión de las curvas para linealidad para el compuesto 1 , 5 y 6	84
35	Ajuste no compartimental de los perfiles farmacocinéticos de los compuestos 1 , 5 y 6 en el estudio preliminar	86
36	Ajuste No Compartimental del compuesto 1 y sus metabolitos compuesto 5 y 6	88
37	Ajuste no compartimental de la administración de compuesto 5	90
38	Comparación de los métodos de cuantificación en plasma humano y de ratón mediante la Prueba de t de Student	93
39	Estimación de solubilidad acuosa de los compuestos 1-4 y ABZ utilizando la ecuación de Yalkowski	95

RESUMEN

La terapia antihelmíntica se ha basado esencialmente en el uso de fármacos con amplio espectro de actividad como los bencimidazoles, Mebendazol (MBZ) y Albendazol (ABZ), pertenecientes al grupo de los carbamatos de metilo y que han mostrado gran efectividad contra los helmintos. Una característica común de estos últimos compuestos, es que la mayoría de ellos son poco solubles en medios acuosos, lo cual ocasiona que muestren baja biodisponibilidad y en consecuencia efectividad errática y disminuida contra las infecciones sistémicas de helmintos cuando se administran por vía oral. En tratamientos clínicos, los carbamatos han mostrado una alta variabilidad interindividual. Por esta razón es necesario continuar con la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antihelmíntica que presenten mejores características biofarmacéuticas. En este trabajo se evaluó la solubilidad, el coeficiente de partición, el pK_a y la permeabilidad aparente de una serie de nuevos derivados de la [*1H*-bencimidazol-5(6)-il]carboxamida (compuestos **1-4**), los cuales presentan un grupo metiltilio en posición 2. Adicionalmente se realizó la farmacocinética del compuesto **1** en ratones Balb/C, como molécula representativa de la serie. En los resultados obtenidos, se encontró que los compuestos **1-4** fueron más solubles en disolventes acuosos y orgánicos que el ABZ, fármaco de primera elección en el tratamiento de las helmintiasis. En la determinación del coeficiente de partición en un sistema *n*-octanol/buffer de fosfatos, los compuestos bajo estudio presentaron valores semejantes a los obtenidos para otros derivados bencimidazólicos. El ABZ mostró el mayor valor de Log P. Todos los compuestos mostraron 2 valores de pK_a , con lo que se concluye que son anfipróticos y que en un intervalo de pH entre 5 a 9 se encuentran en su forma no protonada, lo que favorecería su absorción a nivel intestinal. Los estudios de permeabilidad aparente (Papp) en células Caco-2 y MDCK muestran que estos compuestos son de alta permeabilidad, aunque el ABZ mostró valores correspondientes a un compuesto de baja permeabilidad en contraste al valor de su coeficiente de partición. La relación AB/BA en los compuestos bajo estudio fue mayor a 1, indicando la posibilidad de que algún tipo de transporte activo esté involucrado en el transporte de estos nuevos derivados.

El estudio farmacocinético en ratones Balb/C mostró altos niveles plasmáticos de compuesto **1** y su sulfóxido (compuesto **5**) desde los primeros 5 minutos. Esto sugiere que el compuesto **1** es rápidamente metabolizado en el intestino delgado. Por otro lado, los niveles de sulfona (compuesto **6**) fueron menores que los correspondientes al compuesto **5**. El tiempo de vida media y el tiempo medio de residencia (TMR) del compuesto **1** y sus principales metabolitos indican que su eliminación es muy rápida. Se ha considerado realizar mayores estudios en otras especies de mamíferos con el propósito de entender el comportamiento farmacocinético de estos nuevos compuestos.

ABSTRACT

The treatment for intestinal helminthiasis is usually carried out with benzimidazole 2 carbamate drugs (BZC), which have a wide spectrum of activity such as Albendazole (ABZ) and mebendazole (MBZ). However, the treatment of systemic parasitosis with these types of drugs requires high doses and long treatments because of their poor solubility in body fluids; this decreases their absorption and bioavailability. In clinical trials, these drugs have shown a high interindividual variability. Thus, it is necessary to continue with the search for new drugs with better biopharmaceutical properties. In this work, we evaluated some physicochemical properties (solubility, partition coefficient, pK_a and apparent permeability) of a series of new (1*H*-benzimidazol-5(6)-yl)carboxamide derivatives (compounds **1-4**), which have a methylthio group in 2-position. Additionally, a pharmacokinetic study in Balb/C mice was performed, using the compound **1** as a representative molecule of the series. In our results, we found that compounds **1-4** were more soluble than ABZ in both, aqueous and organic solvents. In Log P determination, the compounds under study had similar values as other benzimidazolic derivatives. The ABZ showed the higher value of Log P. All compounds had two pK_a values, and we concluded that they are amphiprotic molecules, and they could act as neutral species in the pH interval between 5 and 9, which is relevant in the absorption process.

The Papp in Caco-2 and MDCK systems indicates that the 4 derivatives are highly permeable drugs, but it is possible that an efflux system could be involved in the transport of these compounds because the BA/AB ratio was higher than 1. ABZ had a low Papp value, in contrast to their Log P value.

In a pharmacokinetic study performed with Balb/C mice, plasma levels of compound **1** and its sulfoxide (compound **5**) were high after the first 5 min. This fact strongly suggests that compound **1** is rapidly metabolized in the small intestine. On the other hand, the sulfone metabolite (compound **6**) levels were lower than those of compound **5**. The half life and mean residence time (MRT) of compound **1** and its main metabolites indicate that their elimination is very rapid. More studies in mammalian species are necessary in order to understand the pharmacokinetic behavior of these novel compounds.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones parasitarias provocadas por helmintos se consideran un problema de salud pública por su alta incidencia principalmente en países en vías de desarrollo, donde la población infantil y los sectores marginados son los más afectados. En países desarrollados, la prevalencia de este tipo de parásitos se concentra en el sector ganadero, con sus consecuentes pérdidas económicas. Los helmintos se subdividen en tres grupos de importancia clínica: nematodos, trematodos y cestodos. Varios especímenes de estos grupos se alojan en el intestino del huésped de forma permanente, aunque algunos de ellos presentan un desarrollo que incluye la migración hacia tejidos extraintestinales, principalmente en etapas larvianas. La terapia antihelmíntica tanto en humanos como en el área veterinaria, se ha basado esencialmente en el uso de fármacos con amplio espectro de actividad y entre los más utilizados están el pamoato de pirantel, las piperazinas, la ivermectina, el prazicuantel (PZQ), la nitazoxanida (NZ) y los bencimidazoles (BMZ) (Sharma, 1994). Durante las últimas décadas, este último grupo ha sido de gran relevancia, ya que desde su descubrimiento se observó la actividad que presenta contra una gran variedad de parásitos, incluyendo los helmintos. De esta manera, el núcleo bencimidazólico ha sido modificado ampliamente dando origen a nuevos fármacos con características de actividad dirigidas hacia blancos específicos en los parásitos. Entre los bencimidazoles que han mostrado mayor efectividad contra los helmintos se encuentran el mebendazol (MBZ) y el albendazol (ABZ), derivados bencimidazólicos con un grupo carbamato de metilo en la posición C-2, que han sido utilizados por su amplio espectro de actividad, incluso contra etapas larvianas de algunos helmintos y mostrando mínimos efectos secundarios hacia el huésped. Una característica común de los bencimidazol carbamatos en particular, es que la mayoría de ellos son poco solubles en medios acuosos, lo cual ocasiona que cuando se administran por vía oral, muestren baja biodisponibilidad y en consecuencia efectividad errática y disminuida contra las infecciones sistémicas de helmintos. Este problema limita el uso de estos fármacos para el tratamiento de infecciones sistémicas por lo que es necesario encontrar nuevas moléculas alternativas que además de conservar o mejorar su espectro de actividad, presenten mejores propiedades fisicoquímicas que favorezcan su solubilidad en medios acuosos y en consecuencia su biodisponibilidad.

De esta problemática se deriva la necesidad de conocer la solubilidad y permeabilidad de aquellos fármacos potenciales que tiene actividad a nivel sistémico. La agencia norteamericana de Administración de Fármacos y Medicamentos (FDA por sus siglas en inglés) recomienda evaluar dichas propiedades en nuevas moléculas potencialmente activas y catalogarlas conforme al Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB), con lo que se permitiría hacer una estimación de su comportamiento *in vivo*.

En el presente trabajo se determinaron los valores de pK_a , Log P y permeabilidad aparente en la línea celular Caco-2 de 4 nuevos agentes antihelmínticos derivados de la [1*H*-bencimidazol-5(6)-il]carboxamida y el comportamiento farmacocinético de una de dichas moléculas como elemento representativo del grupo.

2. ANTECEDENTES

2.1 INFECCIONES SISTEMICAS POR HELMINTOS

Las parasitosis provocadas por helmintos se presentan con gran frecuencia en países con poco o nulo desarrollo socioeconómico, viéndose favorecida la proliferación de éstas por condiciones climáticas cálidas o templadas y por la falta de cultura de higiene en la población. En países desarrollados las enfermedades parasitarias en el humano han sido prácticamente erradicadas o tienen muy poca significancia, excepto en el sector ganadero donde su prevalencia es un problema de consideración (Botero y Restrepo, 1999). Generalmente los grupos más vulnerables a las enfermedades parasitarias son los niños y la población de sectores marginados, ya que su transmisión se realiza principalmente por fecalismo, contagio o por contacto con el suelo.

El impacto global de las enfermedades parasitarias en el mundo es importante, pues inciden de manera significativa sobre la salud, la esperanza de vida al nacimiento y la productividad de millones de personas. Su prevalencia está estrechamente vinculada a diferenciales climáticos, fenómenos demográficos y al desarrollo socioeconómico de las diferentes zonas del planeta. Por esta razón, los helmintos son parte de la vida cotidiana en los trópicos, aunque su presencia sea global. Debe considerarse que más del 75 % de la población mundial se encuentra en países en vías de desarrollo y que el 50 % está constituida por personas menores de 15 años de edad, etapa en que se presenta la mayor mortalidad por enfermedades infecciosas, incluyendo entre estas las parasitosis helmínticas (Tabla 1). (Tay Zavala y cols., 2003)

Tabla 1. Prevalencia de parasitosis a nivel mundial (OMS, 1999)*.

PREVALENCIA MUNDIAL ESTIMADA DE PARASITOSIS	
Parasitosis	Prevalencia Global (en millones)
Toxoplasmosis	2000
Malaria	300
Entamoebiosis	400
Ascariosis	1000
Uncinariosis	900
Filariosis	250
Estrongiloidosis	80
Enterobiosis	100
Hidatidosis	50
Esquistomosis	300
Leishmaniosis	2
Giardiasis	200

A lo largo de la República Mexicana se presentan frecuencias variables de enfermedades parasitarias debido a su gran diversidad geográfica y marcadas diferencias socioeconómicas (Tabla 2). De estos datos se puede verificar la prevalencia de parasitosis helmínticas con presencia extraintestinal y que requieren de tratamiento con medicamentos efectivos (Tay Zavala y cols, 2003).

Tabla 2. Frecuencia de Helmintosis intestinales en México (2000 Y 2005).

MÉXICO: FRECUENCIA DELAS HELMINTOSIS INTESTINALES		
Año	2004	2005
HELMINTOSIS	No. de personas infectadas	
Taeniasis	2108	1935
Ascariasis	909753	759030
Enterobiasis	142644	118143
Enfermedades infecciosas intestinales	2303948	1882945
Otras helmintiasis	32317683	30899731

* Fuente: Boletín de Epidemiología, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (2006).

2.2 LAS INFECCIONES SISTÉMICAS

Los parásitos helmintos que infectan al humano son de tres grupos de importancia: nematodos, trematodos, y cestodos. En general, este tipo de parásitos presentan un ciclo de vida complejo: algunas especies desarrollan una parte de este ciclo en el intestino delgado del huésped (*Ascaris lumbricoides*, Figura 1), mientras que otras presentan etapas de desarrollo en el ambiente externo

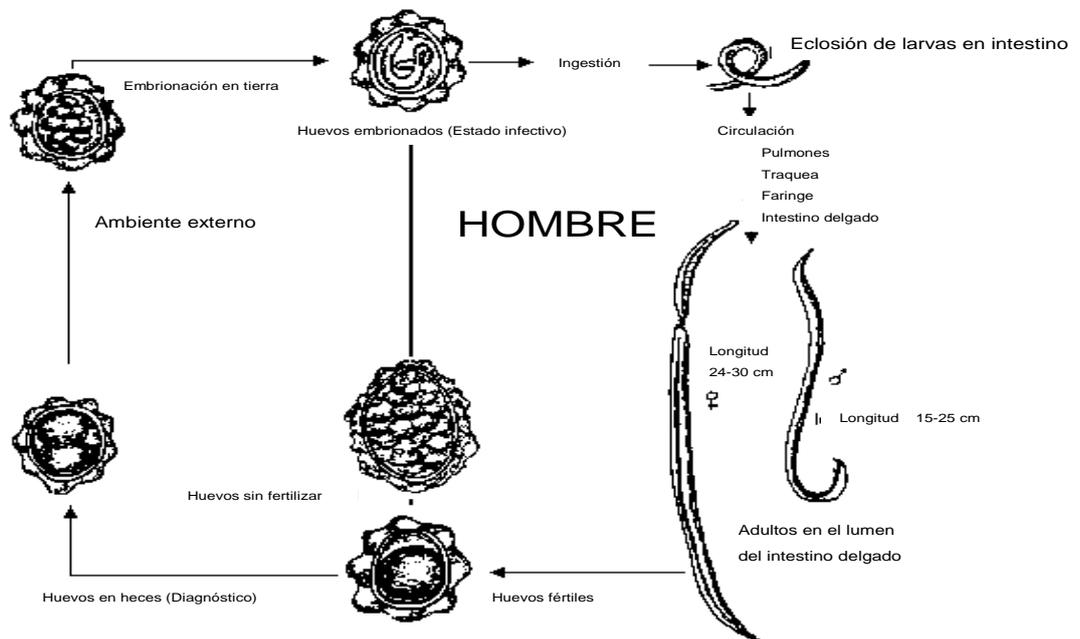


Figura 1. Ciclo biológico de *Ascaris lumbricoides*.

(en materia fecal, agua estancada o tierra contaminada con huevecillos de helmintos). La infección puede adquirirse por diferentes vías, provocada por los huevecillos fecundados (vía oral) o por larvas (cercarias y metacercarias); éstas pueden alojarse en el intestino delgado y migrar a diferentes tejidos del organismo. Algunos helmintos se desarrollan hasta la etapa adulta en tejidos específicos (*Fasciola hepatica* en el hígado) o retornan al intestino delgado, el cual será su hábitat definitivo en su etapa adulta (*Ascaris lumbricoides*); aunque también migran a diferentes tejidos durante su etapa larvaria (cisticerco de *T. solium*) donde permanecerán sin desarrollar su etapa adulta. La mayoría de los parásitos helmintos se desarrolla de manera definitiva en el intestino delgado sin modificar su estadio, y convierten al huésped en un portador del parásito y fuente de infección (Botero y Restrepo, 1999; Mansour, 2002; Tay Zavala y cols., 2003).

Existen también diversas formas de infecciones tisulares por helmintos, y estas generalmente presentan compromiso sistémico. Un ejemplo son las filariasis producidas por nematodos filiformes, de las cuales, los adultos presentan localización tisular y las formas embrionarias se encuentran en los tejidos o en la sangre de donde son tomados por artrópodos vectores. La

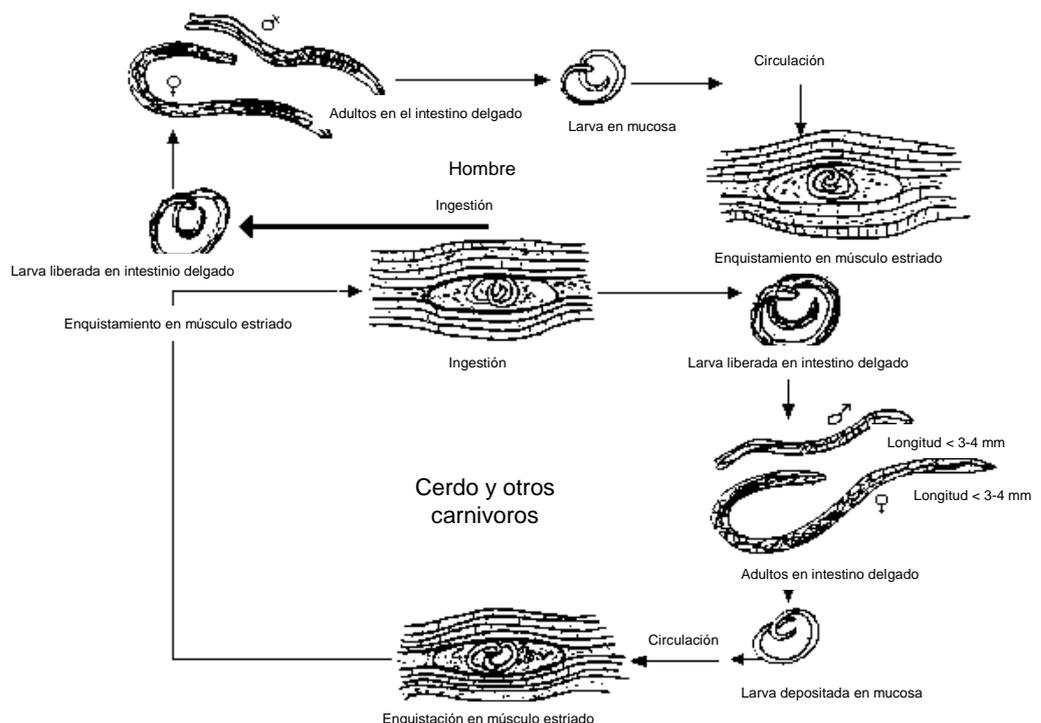


Figura 2. Ciclo biológico de *Trichinella spirallis*.

triquinelosis es adquirida a través del consumo de carne de cerdo contaminada con larvas de *T. spirallis* (Figura 2), y aunque en el hombre los parásitos adultos se localizan en intestino, la importancia de esta enfermedad reside en la acción de las larvas en los tejidos. Existen parasitosis transmitidas por roedores, tales como la angiostrongiloidosis producida por *Angiostrongylus costaricensis* y *A. cantonensis* que pueden producir la meningoencefalitis eosinofílica y la angiostrongilosis intestinal. Las trematodosis son producidas por gusanos aplanados (platelmintos) y en forma de hoja. Entre las más importantes se encuentran la esquistosomosis, que afecta tejidos y sangre, fasciolosis y clonoquinososis, que afectan principalmente el hígado, y la paragonomosis que afecta el tejido pulmonar (Figura 3). De las formas larvarias que infectan los tejidos del huésped se encuentran las larvas de *Ascaris lumbricoides*, *Toxocara canis* (síndrome de migración larvaria visceral), *Ancylostoma braziliense* (síndrome de migración cutánea) y la larva de *T. solium* (cisticercosis), que en su fase más crítica produce la neurocisticercosis al alojarse en el sistema nervioso central (Botero y Restrepo, 1999).

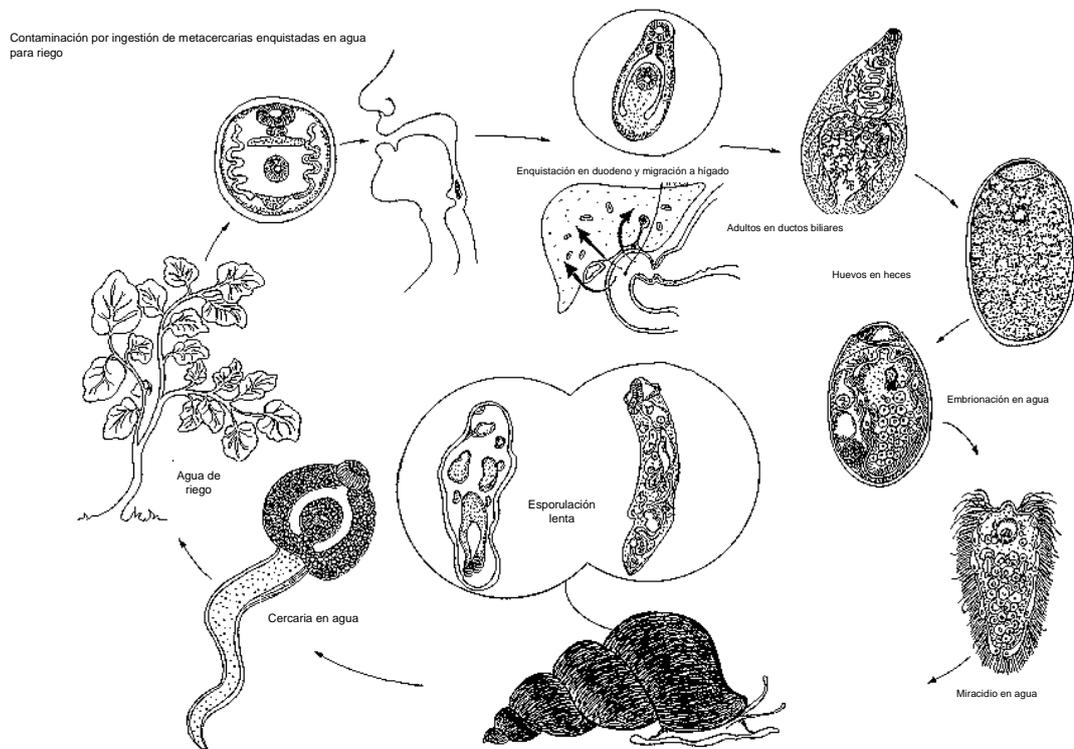


Figura 3. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.

2.3 TRATAMIENTO DE INFECCIONES HELMINTICAS

El tratamiento de las infecciones helmínticas se ha realizado durante los últimos 40 años utilizando principalmente agentes químicos. La introducción de la fenotiazina (1940) y la piperazina (1954) como antihelmínticos proporcionó compuestos con actividad contra especies parasíticas y con aceptable tolerancia en los organismos huéspedes. Entre 1960 y 1980 el descubrimiento del tiabendazol y levamizol proporcionó compuestos con potencia *in vivo* en mg/kg de peso corporal, en vez de dosis de g/kg y en el caso del tiabendazol, dejó al descubierto un grupo estructural de análogos, los bencimidazoles, con excelente espectro de actividad y seguridad (Horton, 1990). El descubrimiento de la ivermectina en 1981 permitió un mejor tratamiento de parasitosis en animales, ya que mostró un amplio espectro de actividad, con dosis efectivas de $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso. A finales de la década de los 80's, se introdujo el prazicuantel (PZQ), el cual fue efectivo contra gusanos intestinales e infecciones de *Chlonorchis sinervis*, *Fasciola hepática*, paragonimiasis y cisticercosis (McKellar y Jackson, 2004). La Tabla 3 muestra un resumen de los fármacos utilizados en la actualidad para el tratamiento de helmintosis que afectan al humano, principalmente a nivel sistémico, y el esquema de tratamiento recomendado.

2.4 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS

Los agentes quimioterapéuticos presentan una gran variedad de mecanismos de acción que han sido estudiados ampliamente, y aunque no se han elucidado en su totalidad, en algunos casos se ha encontrado una alta especificidad contra los parásitos, con un efecto mínimo sobre las células del huésped (Sharma, 1994; Mansour, 2002; Dayan, 2003). Algunos mecanismos conocidos se describen a continuación.

2.4.1 Fármacos que afectan sistemas metabólicos en helmintos

Algunos fármacos antiparasitarios actúan principalmente sobre el mecanismo energético del parásito, inhibiendo una ruta metabólica o una enzima en particular. En el caso de la **ditiazina**, un agente antinematodal de amplio espectro (Figura 4 d), se ha sugerido que

causa la inhibición del sistema de fosforilación a concentraciones muy bajas en la mitocondria de *A. lumbricoides*.

El **diclorofeno** y **niclosamida** (Figura 4 e) son capaces de disminuir marcadamente la actividad de las reacciones involucradas en la incorporación de fosfato inorgánico a ATP bajo condiciones anaeróbicas en la mitocondria en cestodos actuando como desacoplantes del sistema transportador de electrones en la mitocondria. El **levamisol** (Figura 4 f), agente antinematodos de amplio espectro, tiene un efecto inhibitorio selectivo contra la fumarato reductasa de *Ascaris lumbricoides* y otros nematodos relacionados. El **bitionol** (2,2'-tiobis-diclorofenol, Figura 4 g) es otro agente antinematodo que parece afectar indirectamente el sistema NADH-succinato reductasa del músculo de *Ascaris* (Mansour, 2003). La **nitazoxanida** (NTZ, Figura 4 h) fue descrita por primera vez en 1984 como un cestocida en humanos que era efectivo contra *T. saginata* y *H. nana* administrando una sola dosis. El desarrollo de la NTZ fue reinicializado en 1994 después de que se descubrió su actividad antiprotozoaria. Otra de las características de la NTZ es su actividad contra helmintos intestinales comunes. Se han reportado estudios que demuestran que la NTZ es bien tolerada, y en

Tabla 3. Fármacos utilizados para el tratamiento de helmintosis que afectan al humano a nivel sistémico.

Parasitosis	Agente causal	Fármaco	Tratamiento
Filariosis	<i>Wuchereria bancrofti</i> <i>Brugia malawi</i> <i>Brugia timori</i>	Ivermectina*	400µg/kg/dosis única 6 mg/kg/día/dosis única
		Dietilcarbamazina*	
Oncocercosis	<i>Onchocerca volvulus</i>	Ivermectina	200 µg/kg dosis única
		Amocarcina	2 mg/kg/día/3 semanas
		Dietilcarbamazina	1g/semana/5 semanas
		Suramina	6 mg/kg/día/3 días
Triquinosis	<i>Trichinella spirallis</i>	Piperazina*	50 mg/kg/día/20 días
		Pamoato de pirantel	10 mg/kg/día/5 días
		Mebendazol	400 mg/día/5 días
		Albendazol	400 mg/2 veces al día/6 días
Angiostrongilosis	<i>Angiostrongylus castaricensis</i> <i>A. cantonensis</i>	Albendazol	2 semanas
		Mebendazol	
Lagochilascarosis	<i>Lagochilascaris minor</i>	Levamisol	450 mg/día/8 días
		Dietilcarbamazina	
		Cambendazol	
		Tiabendazol	50 mg/kg/día/3 días
		Albendazol	200 mg/kg/20 días
Esquistosomosis	<i>Schistosoma haemobotrium</i> , <i>S. japonicum</i> , <i>S. mansoni</i>	Oxamniquina	10-20mg/Kg/dosis única
		Prazicuantel	30 mg/kg
		Metrifonato	10 mg/Kg/2 semanas /3 ocasiones
Fasciolosis	<i>Fasciola hepatica</i>	Bitionol	40 mg/kg/15 días alternados
		Prazicuantel	75 mg/kg/día/7 días

		Triclabendazol	10 mg/kg/dosis única
Clonorquinosis	<i>Clonorchis sinervis</i>	Prazicuantel	60-75 mg/kg/2 días
Opistorquiosis	<i>Opisthorchis</i>	Prazicuantel	
Paragonimosis	<i>Paragonimus westermani</i> , <i>P. kellicoti</i> , <i>P. africanus</i> , <i>P. mexicanus</i> .	Prazicuantel	75 mg/kg/día/3 días
		Bitionol	50 mg/kg/día/10 días alternados
Eosinofilia pulmonar (Síndrome de Loeffler)	Larvas de ascaris, uncinarias, estrombiloides y de filarias	Tiabendazol	50 mg/kg/día/3 días
		Albendazol	400 mg/dosis única
		Mebendazol	300 mg/día/3 días
		Pamoato de pirantel	10 mg/kg/dosis única
Síndrome de Migración larvaria visceral o Toxocariosis	Larvas de <i>Toxocara canis</i> y <i>T. Cati</i>	Tiabendazol	30 mg/kg/varios días
		Albendazol	10-20 mg/kg/día/3 semanas
Síndrome de migración cutánea	Larvas de <i>Ancylostoma braziliense</i> , <i>A. caninum</i> , <i>A. duodenale</i> y <i>Necator americanus</i>	Albendazol	400 mg/día/3-5 días
		Tiabendazol	75 mg/kg/5-10 días
Cisticercosis/Neurocisticercosis	Larva de <i>Taenia solium</i> .	Prazicuantel	50 mg/kg/día/15 días
		Albendazol	15 mg/kg/día/14-30 días
Cenurosis	Larvas de <i>T. muticeps</i> y <i>T. Serialis</i>	Tratamiento quirúrgico	
Hidatidosis	<i>Echinococcus granulosus</i> , <i>E. multilocularis</i> , <i>E. oligarthrus</i>	Albendazol	10 mg/kg/4 meses (con intervalos de 15 días de reposo cada mes)
Esparganosis	<i>Diphyllobotrium spp.</i>	Tratamiento quirúrgico	
Dermatitis	<i>Schistosoma spindale</i> , <i>S. boris</i> .	Albendazol	400 mg/día/3-5 días
Gnathostomosis	<i>Gnathostoma spinigerum</i>	Albendazol	400 mg/dos tomas al día/21 días.
		Ivermectina en prueba	

Referencia: Sharma, 1994; Botero y Restrepo, 1999; Dayan; 2003; Tay Zavala, 2003.

* Ver estructuras en Figura 4.

estudios controlados este fármaco no exhibe más efectos adversos que los producidos por los controles placebo, metronidazol, ABZ y PZQ.

Algunos estudios en protozoarios y bacterias han mostrado que la **NTZ** actúa inhibiendo la piruvato ferredoxina reductasa (PFOR), una enzima vital del metabolismo central intermediario en estos microorganismos, y aunque el mecanismo de acción contra helmintos aún no ha sido elucidado, se considera que las enzimas del transporte de electrones anaeróbico puede ser un blanco potencial de este fármaco (Gilles y Hoffman, 2002).

2.4.2 Fármacos que tienen efecto sobre estructuras neuromusculares

El **prazicuantel (PZQ)** es el componente más importante del grupo de los agentes antiesquistosomales. Es un derivado pirazino-isoquinolínico tetracíclico (Figura 4 i) y su actividad antihelmíntica es conferida por el carácter pirazino (2, 1-a) isoquinolina. Este es muy efectivo contra varias especies de esquistosomas en humanos. Además de su mayor eficacia, el PZQ tiene la ventaja de que puede ser administrado por vía oral en

una sola toma, otros agentes antiesquistosomales deben administrarse vía parenteral repetidamente. Por ello el **PZQ** se considera muy valioso y conveniente para la terapia de grandes poblaciones en países en vías de desarrollo. También ha mostrado efectividad contra gusanos intestinales, infecciones provocadas por *Clonorchis* y *Fasciola*, para el tratamiento de la paragonimiasis y cisticercosis, y contra parasitosis provocadas por diferentes especies de cestodos y trematodos que infectan animales domésticos. Se le ha considerado como un antiparasitario de amplio espectro.

El **PZQ** afecta la motilidad del parásito mediante su interacción con los sitios permeables de Ca^{2+} en las células del tegumento y el músculo del parásito, generando una rápida contracción tónica del organismo seguida de parálisis flácida. Mediante microscopía electrónica se ha observado daño superficial (formación de burbujas, con algunas divisiones, y vesiculación) después de la administración de bajas dosis terapéuticas de **PZQ** en la superficie cuticular de parásitos afectados. La intensidad del daño tegumental causado depende de la dosis y la duración del tiempo de tratamiento. Aún no se conoce el mecanismo exacto de la actividad del **PZQ** en el parásito, pero existe evidencia de que el daño provocado se debe a una interacción del fármaco con el sistema inmunológico del huésped, resultando un efecto sinérgico, y en el cual el papel de la respuesta inmunológica es esencial para la actividad del **PZQ** (Brindley y Sher, 1987; Mansour, 2002).

Otros antihelmínticos que actúan contra las estructuras neuromusculares, son los **imidazoles** (levamisol), las **tetrahidropirimidinas** (pirantel), **sales de amonio cuaternario** (befeñium, Figura 4 j) y las **pirimidinas** (metiridina). Estos compuestos tienen como blancos los receptores nicotínicos de los canales iónicos de membrana controlados por acetilcolina en el parásito. El **levamisol** fue introducido en la práctica veterinaria en 1960 como agente antihelmíntico contra *Ascaris* y otras infecciones intestinales por nematodos en animales y ha sido utilizado ampliamente contra las infecciones por nematodos en humanos. El **pirantel** también es efectivo contra muchas infecciones por nematodos en humanos incluyendo las provocadas por *Ascaris*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus* y *Enterobius vermicularis*. Los **imidazoles** y otros antihelmínticos nicotínicos actúan como agonistas uniéndose a los receptores nicotínicos de acetilcolina en cestodos y otros nematodos. Una gran ventaja es que tienen efectos colaterales menores en los receptores nicotínicos del huésped. Se ha demostrado experimentalmente que el **levamisol** induce inhibición neuromuscular y despolarización caracterizada por un incremento en la frecuencia de inflexiones. Eso

provoca parálisis de la neuromusculatura del parásito en estado contráctil. Una vez paralizados, los parásitos son expulsados con el contenido del intestino del huésped, fuera de su ambiente natural en el intestino delgado (Sharma, 1994; Mansour, 2002).

2.4.3 Microtúbulos como blanco en nematodos: Los bencimidazoles

Los bencimidazoles actúan uniéndose a las proteínas del citoesqueleto del parásito, principalmente a la tubulina y bloqueando la formación de la matriz microtubular. Se ha encontrado que las moléculas de tubulina se unen a una variedad de diferentes agentes químicos, entre ellos la **colchicina** y los bencimidazoles.

Anteriormente se pensaba que los blancos principales de los antihelmínticos bencimidazólicos eran diferentes procesos bioquímicos (como la inhibición de la captación de glucosa); sin embargo diversos estudios bioquímicos y genéticos han identificado a la β -tubulina como el blanco principal de los antihelmínticos bencimidazólicos (Lacey y Watson, 1985; Lacy, 1990) (Figura 5). Una de las principales ventajas de los bencimidazoles ha sido que presentan una mayor afinidad hacia la tubulina de los helmintos en relación a la afinidad que presentan hacia la tubulina de mamíferos; con ello, estos fármacos presentan una gran selectividad uniéndose en mayor grado a la tubulina de los parásitos helmintos y con ello provocando también un mayor daño en estas especies (Mansour, 2002).

2.5 TOXICIDAD DE LOS BENCIMIDAZOLES

Los bencimidazoles antihelmínticos (BMZ) desestabilizan el equilibrio tubulina-microtúbulo originando en el parásito una pérdida de la homeostasis celular, con el consecuente desprendimiento y muerte (Scarcella S. y cols., 2007). Esta desestabilización es el resultado de la unión específica y de alta afinidad de los BMZ con la β -tubulina. Los carbamatos de metilo como el MBZ, muestran un amplio espectro de actividad contra diferentes especies de helmintos, pero tienen una actividad mínima contra *Fasciola hepatica* y prácticamente ninguna contra sus larvas. En contraste, el TCB es altamente específico para fasciola, pero presenta una baja actividad contra nematodos, cestodos y otros trematodos. Este efecto es resultado de la diferencia de afinidad entre los bencimidazoles y el sitio de unión en la β -tubulina (Schwab y cols., 2005). De igual forma, la resistencia de los parásitos a estos fármacos está relacionada

a una disminución de su afinidad de unión, resultando en un incremento a la tolerancia para el fármaco (Beech y cols. 1994; Lacey y Gill, 1994). En un gran número de nematodos, la resistencia contra los BMZ ha sido producida por una mutación en la cadena de β -tubulina, donde se presenta la sustitución del aminoácido fenilalanina por tirosina en las posiciones 167 o 200 de la proteína. La mutación de la tirosina en posición 200 parece ser recesiva. Esta misma sustitución se ha encontrado en hongos y protozoarios susceptibles a los bencimidazoles. Los eucariotes que codifican normalmente para tirosina en el codón 200 parecen ser tolerantes a los bencimidazoles, por lo que se concluye que la fenilalanina en las posiciones 167 y 200 es esencial para que los bencimidazoles presenten alta afinidad a la β -tubulina. (Schwab y cols., 2005).

2.5.1 Toxicidad de bencimidazoles en mamíferos.

La toxicidad específica de los bencimidazoles también se debe a su mayor afinidad a la β -tubulina de helmintos en relación a la que presentan por la tubulina de los mamíferos. Mientras las dosis de BMZ utilizadas para el tratamiento de parasitosis helmínticas se encuentran en el rango de 5-25 mg/kg, las dosis tóxicas en mamíferos llegan a alcanzar hasta 6400 mg/kg (Dayan, 2003). La Organización Mundial de la Salud ha reportado algunos datos relevantes sobre este aspecto, en particular para el ABZ y MBZ, los cuales son los bencimidazoles más utilizados en el tratamiento de parasitosis tanto en humanos como en animales domésticos.

2.5.1.1 Toxicidad de ABZ

La dosis letal (LD₅₀) oral para ratones es mayor a 3000 mg/kg, para ratas en de 1320-2400 mg/kg y para conejos es de 500-1250 mg/kg. La administración repetida de ABZ en dosis mayores que 30-40 mg/kg/día por 90 días causa retardo en el incremento de peso y anemia reversible.

Toxicidad genética: el ABZ, como otros bencimidazoles, es genotóxico en pruebas citogenéticas *in vitro*, como muestran las pruebas de micronúcleos de hueso de ratón.

Carcinogenicidad: No existe alguna evidencia de carcinogenicidad en ratas o ratones después de 24 meses utilizando dosis de 400 mg /kg/día.

Toxicidad reproductiva: En extensivos estudios de laboratorio en animales de granja se ha mostrado que altas dosis de ABZ pueden causar muerte del embrión y algunos

otros daños, pero siempre después de altas exposiciones, mayores que las usuales en la práctica clínica.

2.5.1.2 Toxicidad de MBZ

La LD₅₀ oral en ratas es de 1434 mg/kg en machos y 714 mg/kg en hembras y en otras especies como el conejo, es mayor a 1280 mg/kg. En pruebas con dosis repetidas, las ratas que recibieron dosis sobre 127.3 (machos) y 151.6 (hembras) mg/kg/día por 13 semanas, mostraron retraso en su crecimiento, anemia y algunos murieron. Se ha observado daño testicular en ratas macho con altas dosis de MBZ.

Toxicidad genética: El MBZ, como el ABZ, es un agente clastógeno (generan rompimientos en las cadenas de cromosomas) y agente aneugeno (deforman embriones) *in vitro*, y solo son de consideración cuando se sobrepasan las dosis que se reciben en una terapia convencional.

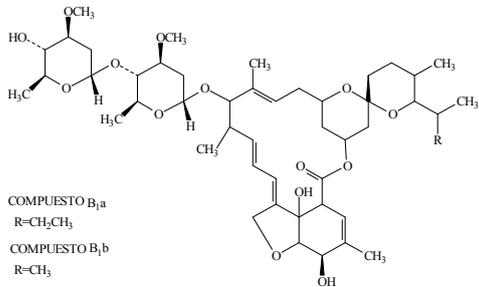
Toxicidad reproductiva: MBZ es un teratógeno en las ratas a ciertas dosis pero no en los conejos. En la rata, el NOEL para fototoxicidad y teratogenicidad es de 10 mg/kg/día, lo que puede producir anomalías esqueléticas y en extremidades. En conejos, las dosis mayores a 40 mg/kg/día durante la gestación no produjeron daño en el feto. No se ha determinado que el MBZ sea teratogénico en cerdos, perros, gatos, ovejas y caballos. Aunque MBZ en altas dosis causa toxicidad fetal y teratogenicidad en ratas, pero no en otras especies, existe una clara demostración de un NOEL en ratas a 10 mg/kg/día durante la gestación.

Carcinogenicidad: La única publicación con esta información no muestra oncogenicidad en ratas y ratones en dosis mayores a 40 mg/kg/día durante 24 meses.

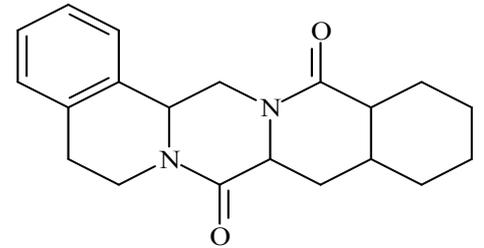
2.6 LOS BENCIMIDAZOLES COMO ALTERNATIVAS PARA EL TRATAMIENTO DE PARÁSITOS HELMINTOS

El descubrimiento de la actividad antihelmíntica de amplio espectro asociada a diferentes bencimidazoles 2,5-disustituídos fue todo un acontecimiento histórico en la quimioterapia de las enfermedades antiparasitarias. Hoy, el bencimidazol es reconocido como un heterociclo versátil en la investigación química-farmacéutica y consecuentemente este ha sido sujeto a una gran variedad de modificaciones estructurales para generar fármacos contra

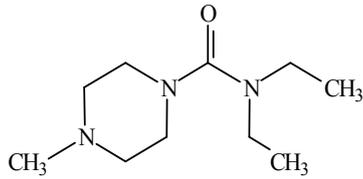
helminos tanto intestinales como extraintestinales (Townsend y Wise, 1990; Sharma, 1994; Botero y Restrepo, 1999).



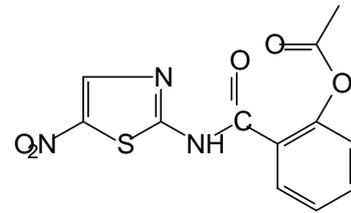
a) Ivermectina



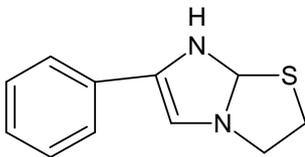
i) Prazicuantel



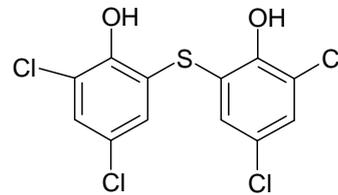
b) Dietilcarbamazina



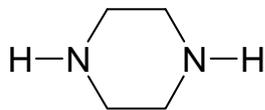
h) Nitazoxanida



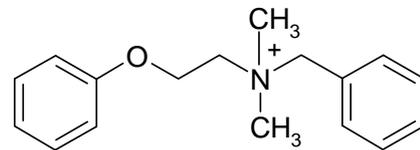
f) Levamizol



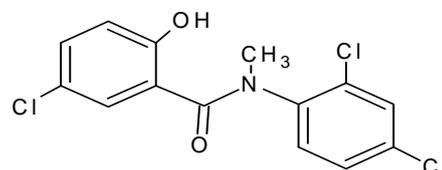
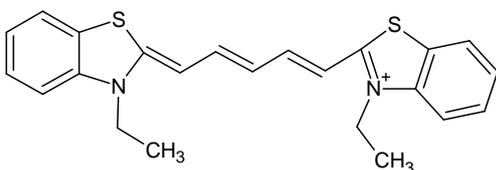
g) BITIIONOL



c) Piperazina



j) Befenium



d) Ditiазина

e) Niclosamida

Figura 4. Estructura química de compuestos antihelmínticos

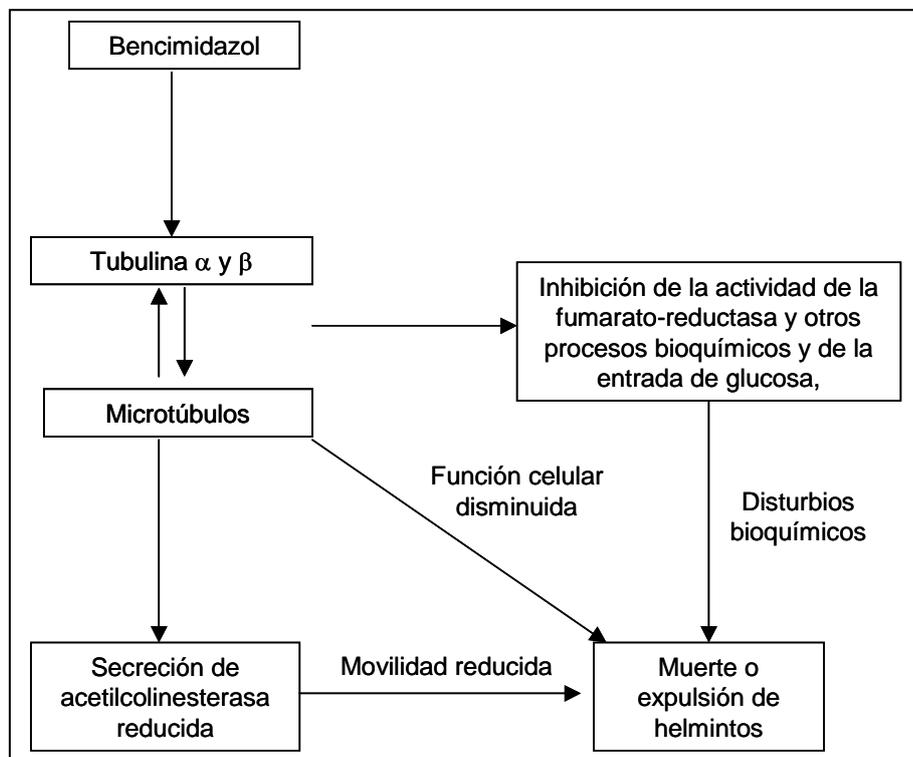


Figura 5. Mecanismo de acción de los bencimidazoles (Sharma, 1994).

2.7 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS BENCIMIDAZOLES

El bencimidazol es un sistema bicíclico fusionado en las posiciones 4 y 5 del anillo heterocíclico y presenta un equilibrio tautomérico (Townsen y Wise, 1990) (Figura 6).

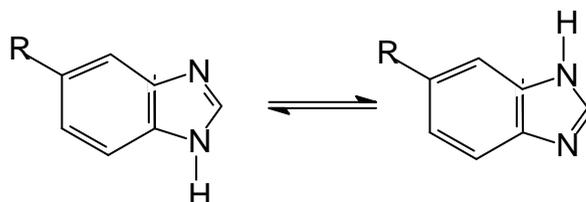
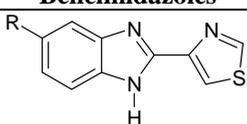
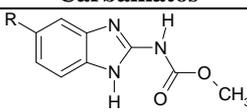
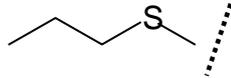
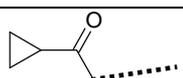
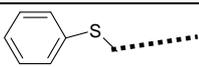
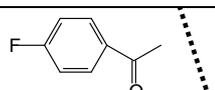
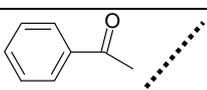


Figura 6. Estructura y equilibrio tautomérico del núcleo bencimidazólico.

En la Tabla 4 se relacionan algunas de las modificaciones que se han realizado al sistema de anillos en la búsqueda de actividad antihelmíntica, así como algunas de sus

propiedades fisicoquímicas. Entre los derivados más activos contra helmintos se encuentran los bencimidazoles carbamatos (Townsen y Wise, 1990; Sharma, 1994), que presentan en posición 2 un grupo carbamato y diferentes sustituciones en posición 5-6 del anillo bencimidazólico. Entre estos compuestos se encuentran el parbendazol, mebendazol, flubendazol, ciclo bendazol, fenbendazol, oxfendazol, Albendazol, oxibendazol y el luxabendazol, los cuales han demostrado ser efectivos para el tratamiento de diferentes infecciones causadas por helmintos en humanos y animales domésticos. Aunque los 2-bencimidazol carbamatos muestran un amplio espectro de actividad contra diferentes helmintos intestinales, virtualmente todos ellos sufren de limitaciones ya que son prácticamente insolubles en agua. Esto provoca baja absorción del fármaco a través del tracto gastrointestinal

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de algunos derivados bencimidazólicos con actividad antihelmíntica

Bencimidazoles		
		
R=	Nombre y propiedades fisicoquímicas	Actividad biológica
(CH ₃) ₂ CHOCONH-	Cambendazol Cristales, p.f. 238 °C, insoluble en agua, soluble en alcohol	Estrongiloidosis
H-	Tiabendazol Cristales, p.f. 304 °C, insoluble en agua, ligeramente soluble en alcohol	Estrongiloidosis, enterobiosis, capilariasis, triquinelosis, larva migrans, toxocaríasis
Carbamatos		
		
R=	Nombre y propiedades fisicoquímicas	Actividad biológica
	Albendazol, p.f. 208 °C Prácticamente insoluble en agua	Ascariosis, trichuriasis, enterobiosis, estrongiloidosis, infecciones de gusanos redondos, y limitada actividad contra trematodos, larvas y adultos
	Ciclobendazol Cristales, p.f. 250 °C	Ascariosis, infecciones de gusanos redondos
	Fenbendazol Polvo, p.f. 233 °C, insoluble en agua	Ascariosis, Infecciones de gusanos redondos, larvas y adultos
	Flubendazol Cristales, p.f. 260 °C, insoluble en agua	Infecciones por gusanos redondos, trichuriasis
	Mebendazol Cristales, p.f. 288 °C, insoluble en agua	Ascariosis, trichuriasis, enterobiosis, estrongiloidosis, infecciones de gusanos redondos,

	Oxifendazol Cristales, p.f. 253°C	larvas y adultos Ascariosis, Infecciones de gusanos redondos, larvas y adultos
	Oxibendazol, p.f. 230 °C Prácticamente insoluble en agua	Infección intestinal de gusanos redondos, ascariosis
	Parbendazol Cristales, p.f. 225 °C, insoluble en agua	Infección intestinal de gusanos redondos, ascariosis

Ref: Campbell, 1990; Sharma, 1994; Botero y Restrepo, 1999; Mansour, 2002; Dayan, 2003.

haciendo que sean débilmente activos o inefectivos contra helmintos invasores de tejido, responsables de causar enfermedades como la filariasis, triquinelosis, dracunculosis, hidatidosis y cisticercosis (Sharma, 1994).

Los bencimidazoles en general, y los bencimidazol carbamatos en particular, son materiales cristalinos con puntos de fusión muy altos y relativamente insolubles en agua. Los derivados bencimidazólicos que no se encuentran sustituidos en los grupos amino en la posición 1 y 3 (Figura 6) poseen características ácido-base ya que debido al equilibrio tautomérico, ambos grupos amino pueden adquirir o perder un protón, como se puede apreciar en la Figura 7 (Jung y cols., 1998). Esta propiedad favorece su disolución en soluciones acuosas ácidas o básicas, mientras que la solubilidad tiende a disminuir considerablemente en soluciones acuosas con pH neutro, hasta ser prácticamente insoluble.

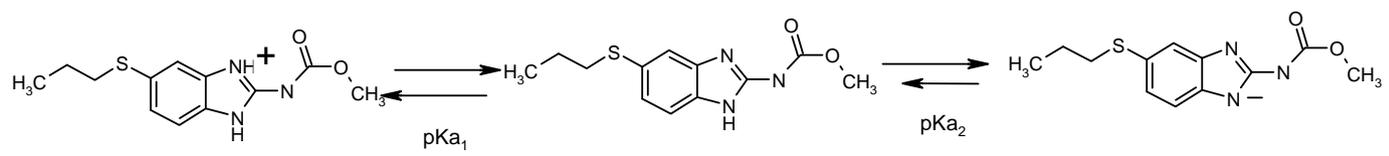


Figura 7. Equilibrio ácido-base del Albendazol (ABZ) (Jung y cols., 1998)

La presencia de diferentes grupos con átomos electronegativos (N y O), tienen la capacidad de formar puentes de hidrógeno intermoleculares, principalmente entre los grupos amino de las posiciones 1 y 3, por lo que es común que las moléculas se asocien entre si (Korolkovas, 1970; Townsend and Wise, 1990), como puede apreciarse en la Figura 8.

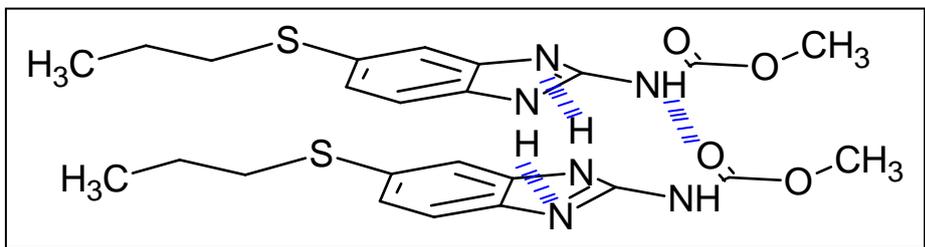


Figura 8. Arreglo espacial de 2 moléculas de Albendazol (Korolkovas, 1970; Townsend and Wise, 1990).

Los bencimidazoles se caracterizan por tener coeficientes de partición octanol/agua altos, lo que les confiere una gran afinidad hacia disolventes orgánicos. Dicha propiedad ha sido utilizada como un estimador de su permeabilidad a través de membranas biológicas (Mottier et al, 2003) (Tabla 5).

Tabla 5. Coeficiente de partición (Log P) de derivados bencimidazólicos con actividad antihelmíntica

Molécula	Coeficiente de partición octanol/agua (Log P)
Fenbendazol (FBZ)	3.93
Albendazol (ABZ)	3.83
Mebendazol (MBZ)	3.73
Oxibendazol (OBZ)	2.60
Triclabendazol (TBZ)	2.55
Oxfendazol (OFZ)	2.03
Ricobendazol (RBZ)	1.24

Referencia: (Mottier y cols., 2003).

2.8 TRANSPORTE ACTIVO DE BENCIMIDAZOLES

El transporte de moléculas a través de las membranas biológicas se realiza esencialmente por difusión pasiva. En el caso de los bencimidazoles antihelmínticos, dicho transporte se lleva a cabo por la vía transcelular, la cual se ve favorecida por su alta lipofiliidad (Tabla 5), sin embargo, existen algunos reportes donde se menciona la posibilidad de que el transporte de diferentes fármacos se realice de forma activa, mediado por sistemas protéicos que se expresan tanto en la membrana apical como en la serosal del epitelio intestinal. Se ha encontrado que estos transportadores se encuentran difundidos en la naturaleza y se expresan en diferentes tejidos y en diferentes organismos (Thomaz-Soccol, 2004). La importancia relativa de la interacción de estos transportadores y los fármacos antihelmínticos radica en que se ha expresado un incremento en la resistencia de los parásitos al tratamiento quimioterapéutico contra diferentes agentes antihelmínticos (Sangster, 1999). Se ha estudiado ampliamente el papel de dichos transportadores, encontrándose que algunos de ellos funcionan como bombas que eliminan el fármaco absorbido, regresándolo al sitio de disposición (efflux).

Tal es el caso de la glicoproteína P perteneciente a la superfamilia de proteínas activadas por ATP (ATP-binding cassette, ABC) (Zhu, 1999, Jonker y cols., 2000) y la proteína de resistencia asociada a cancer de mama (Merino y cols., 2005). Por un lado, la expresión de mecanismos de resistencia en los parásitos representa un problema para su tratamiento, ya que para realizar un tratamiento más efectivo, se requiere de diferentes esquemas y rotación de fármacos en el huésped infectado, sin que esto garantice un 100 % de efectividad. Por otro lado, la presencia de estos transportadores en el epitelio humano puede considerarse una primera barrera para el tratamiento con agentes químicos, y en consecuencia, una disminución en la efectividad del tratamiento.

2.9 FARMACOCINÉTICA DE LOS BENCIMIDAZOLES

2.9.1 Absorción

Estos compuestos normalmente se administran por vía oral y sus formulaciones se han limitado a tabletas y suspensiones en humanos; en el caso de otras especies (rumiantes) se incluyen pastas o gránulos (Formentini, 2005). En diversos estudios se ha mencionado que la limitada absorción de los bencimidazoles se debe principalmente a su baja solubilidad (Cook, 1990). Para el ABZ, se ha encontrado una absorción menor al 5 % en humanos (Rigter y cols., 2004), mientras que para MBZ se ha estimado una absorción variable entre el 2 % hasta un 22 % (Dawson y cols., 1985). En el caso del TBC (antihelmíntico clásicamente utilizado contra *Fasciola hepatica*), se han reportado problemas de biodisponibilidad en diferentes especies animales, debido principalmente a su baja solubilidad en agua (Kinabo y Bogan, 1989; Sanyal, 1995; Sanyal y Gupta, 1996). Es importante resaltar que para los bencimidazoles en general, dada su limitada solubilidad en agua, pequeñas diferencias en ésta podrían tener una mayor influencia sobre la absorción y su eficacia resultante.

2.9.2 Metabolismo de bencimidazoles

Los bencimidazoles antihelmínticos son extensivamente metabolizados en los mamíferos después de su administración oral y parenteral. Los metabolitos principales usualmente resultan de los procesos oxidativos e hidrolíticos y todos son más solubles que el compuesto primario (reacciones de fase I). Todos los compuestos primarios son

de vida relativamente corta y los metabolitos predominan en el plasma, tejidos y productos de eliminación.

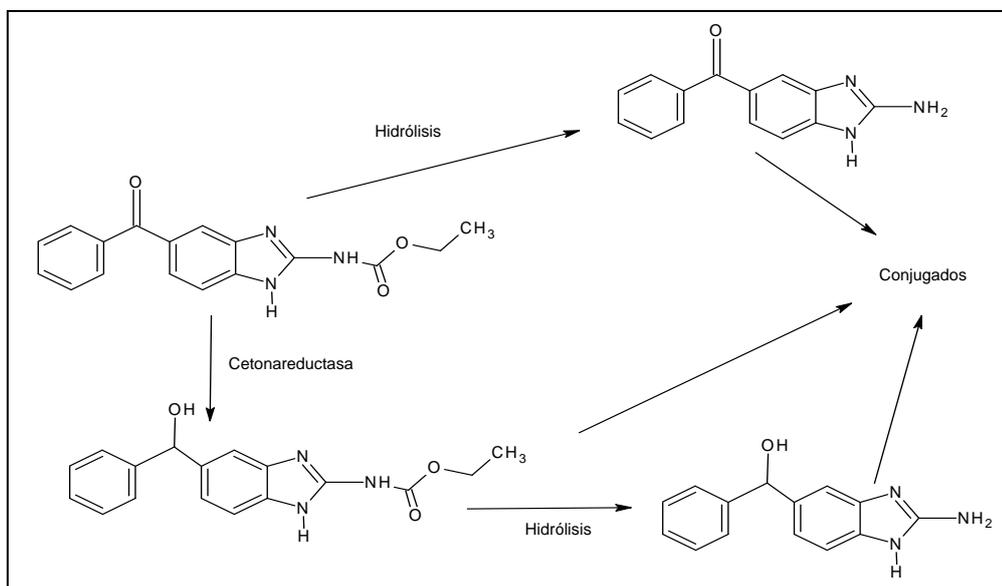


Figura 9. Metabolismo de Mebendazol

La conjugación es un proceso recurrente y en algunos casos los conjugados llegan a ser los productos predominantes (reacciones de fase II). Los metabolitos han sido aislados tanto de orina como de heces, de manera que la presencia en este último tipo de muestra puede deberse principalmente a la baja biodisponibilidad, aunque también se ha encontrado que la excreción biliar contribuye a los niveles fecales. Los perfiles metabólicos de benzimidazoles individuales siguen patrones similares a través de las especies, pero los porcentajes varían sustancialmente (Gottschall y cols., 1990; Sharma, 1994).

El metabolismo primario y la toxicidad de los derivados benzimidazólicos que presentan un grupo carbamato (Tabla 4) está controlado generalmente por el sustituyente en posición 5, donde se ha observado una gran variedad de reacciones de tipo Fase I, incluyendo la hidroxilación (tiabendazol, parabendazol), reducción (mebendazol, Figura 9) y S-oxidación, aunque este último grupo se encuentre localizado en diferentes sitios en el núcleo benzimidazólico (Albendazol, Figura 10; fenbendazol, Figura 11; triclabendazol, Figura 12).

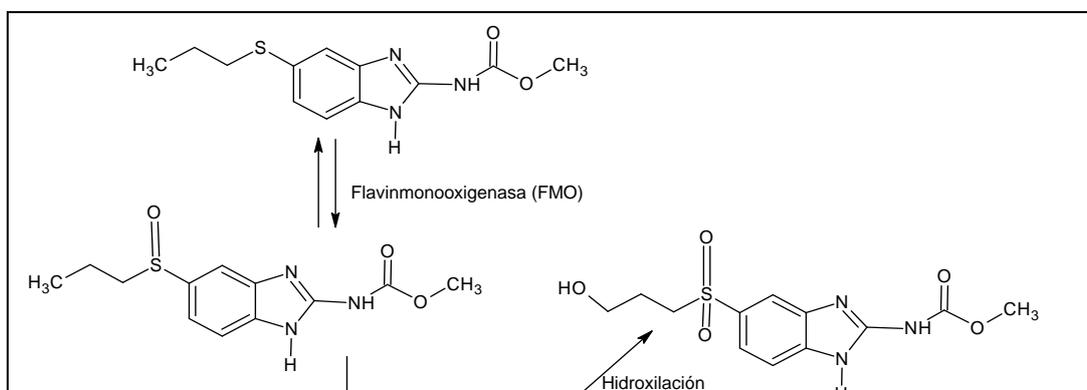


Figura 10. Metabolismo de Albendazol

Aunque la descarboxilación hidrolítica del grupo carbamato a la amina es común, pueden encontrarse otras reacciones que involucran al núcleo mismo (hidroxilación y N-metilación), las cuales ocurren en extensión limitada. Se han descrito numerosos estudios sobre el metabolismo y excreción de los bencimidazoles pero aún no se han elucidado muchos de los mecanismos involucrados (Gottschall y cols., 1990).

2.9.3 Metabolismo de Albendazol

El metabolismo del ABZ se caracteriza por la oxidación del átomo de azufre en la cadena lateral (Figura 10). El sulfóxido y la sulfona son los metabolitos predominantes en el perfil plasmático y también se han encontrado como los mayores metabolitos en la orina, aunque la proporción exacta varía considerablemente entre especies. Sin embargo, en todas las especies estudiadas el ABZ mismo solo fue detectado a nivel de trazas (Dayan, 2003; García y cols., 2003). El sulfóxido de ABZ se considera el mayor metabolito en todas las especies probadas (22.9 a 26.6%), mientras que la sulfona contribuye con cerca del 6 % de todos los metabolitos excretados. Actualmente se conoce que la primera oxidación del ABZ se lleva a cabo tanto por la enzima Flavin Monooxigenasa (FMO) como por el CYP 3A4, complejos enzimáticos expresados ampliamente en el lumen intestinal y en otros tejidos corporales, como el hígado y los pulmones (von Richter, 2004). Se ha encontrado que esta primera oxidación es reversible (Fargetton y cols., 1986; Villaverde y cols., 1995). La segunda oxidación, se realiza extensamente en el hígado por la FMO de manera preferencial (Souhaili-El Amri

y cols., 1988; Moroni y cols., 1995). Existen otras vías menores de transformación que incluyen la hidroxilación aromática y la metilación de nitrógeno y azufre. El sulfóxido de Albendazol se distribuye ampliamente a través del cuerpo, además de unirse en un 70 % a las proteínas plasmáticas.

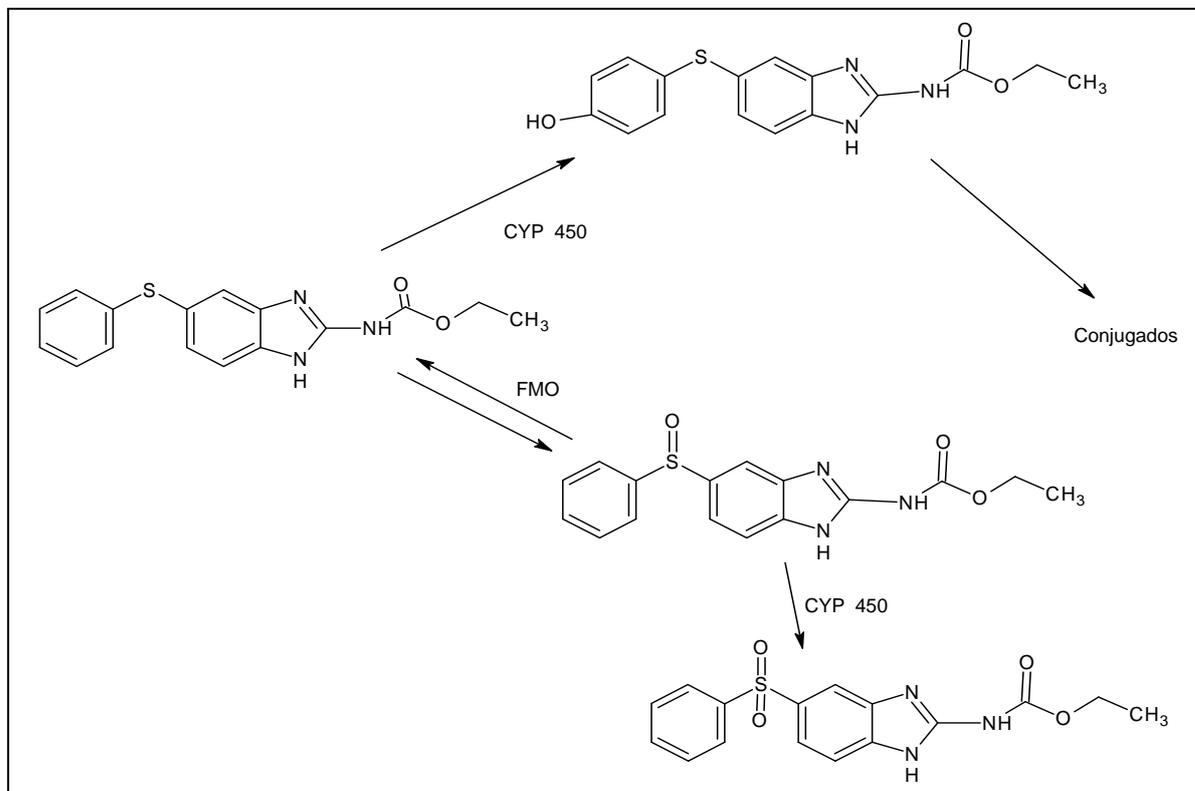


Figura 11. Metabolismo de Fenbendazol

La depuración del compuesto primario es muy rápida en todas las especies, y no se conoce su vida media; sin embargo para sus metabolitos ha sido posible estimar dicho parámetro (Sharma, S., 1994). El tiempo de vida media del sulfóxido en el hombre es de 8 a 12 h, mientras que en la rata es cercano a 4 h (Dayan, 2003), y en ratones de 2 h (García y cols., 2003).

En compuestos como el Fenbendazol y Triclabendazol, también se han obtenido derivados oxidados, de los cuales el sulfóxido correspondiente es activo al igual que la molécula original (oxfendazol y sulfóxido de triclabendazol) (Sharma, 1994, Gokbulut y cols., 2006, Virkel y cols., 2006), mientras el segundo derivado, las sulfonas respectivas, son compuestos inactivos. No se conoce el mecanismo de transformación completo, pero se considera que pueda ser semejante al que se ha elucidado para el ABZ.

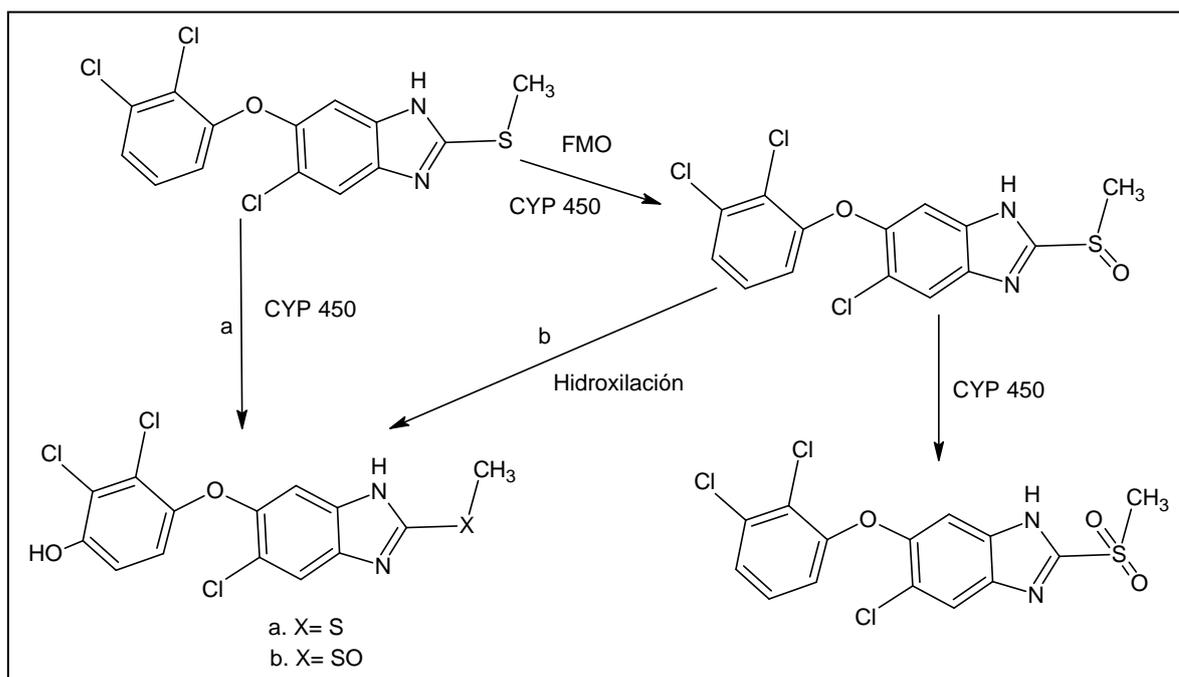


Figura 12. Metabolismo de triclabendazol (TCB).

2.10 FACTORES QUE AFECTAN LA BIODISPONIBILIDAD (BD) DE LOS BENCIMIDAZOLES

La baja solubilidad y por consecuencia su baja absorción son problemas que limitan el uso de muchos bencimidazoles contra parasitosis extraintestinales, en especial los carbamatos (ABZ, MBZ, fenbendazol y oxfendazol). El fenbendazol (FBZ) y ABZ, así como sus derivados oxidados son pobremente absorbidos del tracto gastrointestinal (Lanusse y cols., 1995). Para el tratamiento de parásitos lumbinales, esto es ideal ya que la concentración del fármaco permanece alta, y existe poco riesgo de intoxicación sistémica. Sin embargo, para tratamientos sistémicos, es necesario el ingreso sustancial de los fármacos, y la baja biodisponibilidad oral de los bencimidazoles es una desventaja. Se sabe que el ABZ y FBZ cruzan la membrana por difusión pasiva (Merino y cols., 2002), aunque en recientes estudios se ha encontrado que sus metabolitos oxidados (sulfóxido de ABZ y oxfendazol) son transportados por la proteína de resistencia en cancer de mama (Breast Cancer Resistance Protein, BCRP) en ratones y moderadamente en humanos (Merino y cols., 2005), por lo que la existencia de mecanismos de transporte para derivados bencimidazólicos adicionales aún no puede ser totalmente descartada.

2.11 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES FARMACÉUTICAS DE NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIHELMÍNTICA

Las características biofarmacéuticas del fármaco influyen en la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción (ADME), y son cruciales para una actividad terapéutica adecuada *in vivo*. En las últimas décadas se ha modificado el criterio de basar el diseño de fármacos utilizando solamente las características requeridas para la máxima interacción fármaco-receptor, ahora se consideran también las propiedades farmacocinéticas y las farmacéuticas (van de Waterbeemd y cols., 2001). Las nuevas técnicas para el desarrollo de fármacos como la Química Combinatorial y la exploración de actividad a gran escala, requiere de una evaluación rápida y efectiva de las propiedades biofarmacéuticas de los compuestos sintetizados. Dado que los fármacos que se utilizan en la terapia antihelmíntica a nivel sistémico en la actualidad presentan algunas desventajas relacionadas con sus propiedades fisicoquímicas, biodisponibilidad, y variabilidad interindividual, se considera una necesidad evaluar las propiedades biofarmacéuticas de nuevas entidades en las primeras etapas de su desarrollo, con la finalidad de elegir aquellas que presenten las mejores características y puedan ser consideradas moléculas potenciales como fármacos antihelmínticos y que permitan el tratamiento de parasitosis helmínticas a nivel sistémico (Newton y Meeusen, 2003).

En años recientes se ha implementado el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB) que considera los factores que controlan la velocidad y extensión de la absorción y categoriza los fármacos en cuatro clases de acuerdo a su solubilidad y permeabilidad (Figura 13) (Kasim y cols., 2004). Este sistema es una herramienta de gran utilidad para reconocer las características que influyen en la biodisponibilidad de una molécula, y se ha utilizado ampliamente en estudios de bioequivalencia.

La Food and Drug Administration (FDA) recientemente ha implementado el SCB (Guidance for Industry, 2000) para permitir la clasificación de medicamentos y considerar la exención de pruebas de bioequivalencia de formulaciones con fármacos

pertenecientes al Grupo 1 (Alta solubilidad-Alta permeabilidad). En el desarrollo de nuevos fármacos se considera también adecuado clasificar las nuevas moléculas aplicando el SCB para con ello poder anticipar las características de absorción de las mismas.

Las pruebas que permiten estimar la permeabilidad son: a) los estudios de perfusión en humanos y animales *in vivo e in situ*, b) los estudios de permeación en tejidos intestinales de animales y c) a través de monocapas en cultivos celulares epiteliales *in vitro* muy en particular la línea celular Caco-2, la cual ha mostrado presentar múltiples ventajas como modelo experimental (Artursson y Karlson, 1991; Camenisch y cols., 1997; Balimane y cols., 2000)

	ALTA SOLUBILIDAD	BAJA SOLUBILIDAD
ALTA PERMEABILIDAD	<p>GRUPO I Alta Solubilidad Alta Permeabilidad</p>	<p>GRUPO II Baja Solubilidad Alta Permeabilidad</p>
BAJA PERMEABILIDAD	<p>GRUPO III Alta Solubilidad Baja Permeabilidad</p>	<p>GRUPO IV Baja Solubilidad Baja Permeabilidad</p>

Figura 13. El Sistema de Clasificación Biofarmacéutico.

3. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

Aún cuando a la fecha existe una serie de compuestos antihelmínticos, una gran parte de ellos presenta una baja solubilidad en medio acuoso, lo cual incide en su biodisponibilidad y por ende en la eficacia terapéutica, entonces es necesario continuar con la búsqueda de nuevos compuestos antihelmínticos de acción sistémica.

En el año de 1990 Gupta y cols., sintetizaron el compuesto CDRI 87-144 (Figura 14), el cual tiene un grupo metilcarbamato en posición 2 y un grupo carboxamida en posición 5(6), y mostró ser activo contra infecciones sistémicas de *Ancylostoma ceylanicum*, *Nippostrongylus brasiliensis* y *Syphacia obvelata* (Gupta et al., 1990). De forma similar, el triclabendazol tiene en posición 2 un grupo metiltio y en posición 5(6) un grupo 2,3-diclorofenoxi (Figura 12), lo cual le confiere mayor lipofilicidad y actividad extraintestinal y recientemente ha sido autorizado su uso en humanos (Fairweather, 2005).

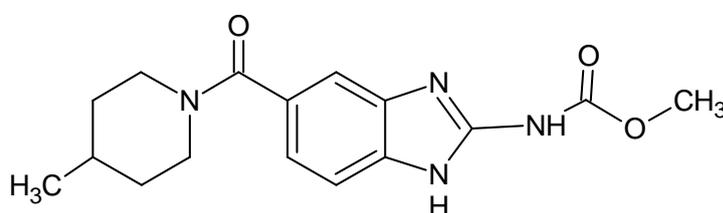
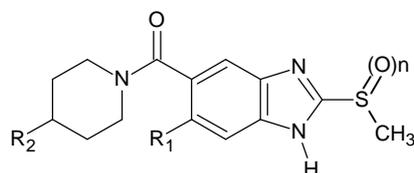


Figura 14. Estructura del CDRI 87-144

En un esfuerzo por conjuntar las características de amplio espectro de actividad del CDRI-87-144 y la liposolubilidad del TCB, se sintetizó una serie de nuevos derivados bencimidazólicos, los derivados [*IH*-bencimidazol-5(6)-il]carboxamida (Tesis doctoral de la M. en C. Alicia Hernández Campos, datos no publicados), mediante un procedimiento previamente reportado (Soria-Arteche y cols., 2005), los cuales mostraron actividad contra larvas de *T. spirallis in vitro* (Tabla 6) y que podrían considerarse como alternativas terapéuticas contra infecciones sistémicas de helmintos. Por lo anteriormente mencionado, se justifica el presente estudio que permitirá determinar las características biofarmacéuticas de este grupo de moléculas nuevas.

Tabla 6. Derivados [*1H*-bencimidazol-5(6)-il]carboxamida evaluados.

Compuesto	R ₁	R ₂	n
1	H	H	0
2	Cl	H	0
3	H	CH ₃	0
4	Cl	CH ₃	0
* 5	Cl	CH ₃	1
* 6	Cl	CH ₃	2

* Los compuestos **5** y **6** se sintetizaron únicamente como probables metabolitos del compuesto **1** y se utilizaron como estándares para estudios farmacocinéticos.

% Reducción de la viabilidad de las larvas musculares de *T. spiralis* ocasionada por los compuestos **1-4** y ABZ

μM	1	2	3	4	ABZ
3.77	61	48	27	35	64
0.377	39	29	20	25	35
0.0377	28	19	5	23	27
0.00377	24	15	NR	18	25
0.000377	10	12	NR	9	18

Cada valor es el promedio de tres determinaciones

La evaluación de actividad fue realizada en la Unidad de Investigación en Enfermedades Parasitarias del Hospital de Pediatría, en el Centro Médico Nacional del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el Laboratorio de la Dra. Lilián Yépez Mulia (Datos no publicados).

4. HIPÓTESIS

Los nuevos derivados [*1H*-bencimidazol-5(6)-il]carboxamida, al conservar un grupo carboxamida en su estructura, presentarán mejores características de solubilidad, lo que mejorará su biodisponibilidad en relación a la del ABZ.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar algunas propiedades fisicoquímicas (solubilidad, pK_a , coeficiente de partición) de los nuevos derivados bencimidazólicos, su permeabilidad aparente en las líneas celulares Caco-2 y MDCK, y los parámetros farmacocinéticos del compuesto **1** en ratones Balb/C, como molécula representativa de la serie, y verificar que tienen mejor biodisponibilidad que el ABZ, utilizado como fármaco antihelmíntico con actividad sistémica de primera elección.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Evaluar las constantes de disociación de las nuevas moléculas, mediante una técnica espectrofotométrica.
- ❖ Desarrollar y validar los métodos para la cuantificación de las nuevas moléculas en solución salina de Hank's.
- ❖ Determinar la solubilidad de las nuevas moléculas en una serie de disolventes acuosos y orgánicos.
- ❖ Evaluar el coeficiente de partición de las nuevas moléculas en un sistema n-octanol-agua a pH 7.4.
- ❖ Evaluar la permeabilidad relativa de las nuevas moléculas en las líneas celulares Caco-2 y MDCK.
- ❖ Desarrollar y validar un método para la cuantificación simultánea del compuesto **1** y sus posibles metabolitos (sulfóxido y sulfona) en plasma de ratón y plasma humano.
- ❖ Evaluar el perfil farmacocinético del compuesto **1** y sus principales metabolitos en ratones Balb/C.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1 MATERIALES Y EQUIPOS

6.1.1 ESTUDIOS *IN VITRO*

6.1.1.1 Compuestos evaluados

Compuesto **1**, peso molecular: 275 g/mol

Compuesto **2**, peso molecular: 309 g/mol

Compuesto **3**, peso molecular: 289 g/mol

Compuesto **4**, peso molecular: 323.5 g/mol

Sulfóxido de compuesto 1 (Compuesto **5**).

Sulfona de compuesto 1 (Compuesto **6**).

Todos ellos sintetizados por la M. en C. Alicia Hernández Campos en el Laboratorio 122, Edif. E, Facultad de Química, UNAM.

Fármacos:

ABZ, peso molecular: 265.3 g/mol (Sigma Aldrich).

Atenolol, peso molecular: 266 g/mol (Sigma Aldrich).

Propranolol, peso molecular: 195.8 g/mol (Sigma Aldrich).

6.1.1.2 Metodología analítica para la cuantificación de los compuestos 1-4, y los fármacos ABZ, Atenolol y Propranolol en solución salina de Hank's

6.1.1.2.1 Reactivos

Agua grado HPLC

Metanol grado HPLC (Mallinckrodt).

Acetonitrilo grado HPLC. (Mallinckrodt).

Fosfato monobásico de potasio R.A. (J.T. Baker).

Hidróxido de sodio R.A. (J.T. Baker).

Ácido clorhídrico R.A. (J.T. Baker).

6.1.1.2.2 Equipo

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu con:

Bomba isocrática modelo LC-10AD/vp

Detector ultravioleta-visible modelo SPD-10AVP.

Inyector automático modelo SIL-10 A.

6.1.1.2.3 Soluciones

Solución stock de los compuestos **1-4** (10 mM).

Solución stock de albendazol (10 mM).

Solución stock de atenolol (10 mM).

Solución stock de propranolol (10 mM).

Solución stock de benzoilmetronidazol (BMNDZ) 1.5 mg/mL.

Solución stock de acetaminofén 1.0 mg/mL.

Solución stock praziquantel 1.0 mg/mL.

Solución de Transporte (Solución de Hank's pH 7.4 con D-glucosa 10 mM y HEPES 10 mM).

6.1.1.3 Pruebas de Solubilidad

6.1.1.3.1 Reactivos

NaH₂PO₄ (J.T. Baker).
D-Glucosa (J.T. Baker).
HEPES, sal de Sodio. (J.T. Baker).
Lauril sulfato de sodio. (J.T. Baker).

6.1.1.3.2 Disolventes orgánicos

Etanol (J.T. Baker).
n-Octanol (J.T. Baker).
Dimetilsulfóxido (J.T. Baker).
Tetracloruro de carbono (J.T. Baker).

6.1.1.3.3 Disolventes acuosos

Agua destilada.
Ácido clorhídrico 0.1 N.
Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4
Solución acuosa de lauril sulfato de sodio (LSS) al 1%.
Fluido gástrico simulado sin enzimas (FGS, FEUM, Séptima Edición).
Fluido intestinal simulado sin enzimas (FIS, FEUM, Séptima Edición).

6.1.1.4 Determinación de pKa

6.1.1.4.1 Reactivos

Agua bidestilada.
Soluciones amortiguadoras de pH 4, 7 y 10 (J.T. Baker).
Carbonato de sodio anhidro R.A. (J.T. Baker).
KCl R.A: (J.T. Baker).
NaCl Q.P. (J.T. Baker).

6.1.1.4.2 Equipo

Potenciómetro Accumet 950, con electrodo de vidrio combinado (Fisher Scientific, USA).
Espectrofotómetro uv-visible Hewlett Packard 8453 con regulador de temperatura.
Titulador Titrino Methrom modelo 716 DMS (Metrohm, USA) como dosificador de volumen.

6.1.1.4.3 Soluciones

KCl 0.1 M
Solución valorada de ácido clorhídrico 0.1 N.
Ácido clorhídrico 0.1 N con fuerza iónica 0.15 M (NaCl 0.15 M).
Hidróxido de sodio 0.1 N con fuerza iónica 0.15 M (NaCl 0.15 M).
Solución stock del compuesto (10^{-4} M).
Solución ácida para titulación (compuesto 10^{-5} M).
Solución básica para titulación (compuesto 10^{-5} M).

6.1.1.5 Determinación del coeficiente de partición (Log P)

6.1.1.5.1 Reactivos

Fosfato monobásico de sodio R.A. (J.T. Baker)

6.1.1.5.2 Equipos

Vórtex de agitación oscilatoria.
Centrífuga para tubos Eppendorf.

6.1.1.5.3 Soluciones

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4
Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4 saturada con *n*-octanol.
n-Octanol saturado con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4.
Solución stock del compuesto.
Solución de trabajo del compuesto (concentración 1 mM).

6.1.1.6 Determinación de la permeabilidad utilizando las líneas celulares Caco-2 y Madin Darby Canine Kidney (MDCK)

6.1.1.6.1 Materiales

Cajas de cultivo de 25 cm². (Corning).
Cajas de cultivo de 75 cm². (Corning).
Tubos para cultivo cónicos de 15 y 50 mL. (Corning).
Celdas Transwell de 1 cm de diámetro con poro de 0.4 µm, 12 celdas por placa; cat. 3401 (Costar).
Espectrofotómetro de fluorescencia Fluoroscan Ascent FL (Labsystems).
Placas para fluorimetría Fluoronunc (NUNC)

6.1.1.6.2 Reactivos

Medio Eagle Modificado Dupleco's (DMEM), con alto contenido de glucosa, sin piruvato y con glutamina en polvo (Gibco).
Suero fetal bovino Fetal Clon III (Hyclon).
Aminoácidos no esenciales 100 X (In Vitro, S.A.).
Piruvato de sodio para cultivo celular (In Vitro, S.A.).
L-Glutamina 100 X (In Vitro, S.A.).
Antibiótico (penicilina/estreptomicina, 10000 unidades/100 µg/mL) (In Vitro, S.A.).
Tripsina-EDTA (0.05 y 0.05 % respectivamente) (In Vitro, S.A.).
HEPES, sal de sodio (Sigma Aldrich).
Colágena de tallo de rata tipo I (10 mg/ampolleta), Cat. 1-179-179 (Roche Diagnostic).
Solución salina de Hank's 10 X 100 ml (In Vitro, S.A.).
Ácido acético glacial (J.T.Baker).
Lucifer Yellow (LY), sal de litio (Molecular Probes).

6.1.1.6.3 Soluciones

Medio de cultivo suplementado
Ácido Acético 0.2 % en agua bidestilada.

Colágena 0.99 mg/mL

Medio de Transporte (Solución de Hank's con D-Glucosa 10 mM y HEPES 10 mM, al pH de trabajo).

Solución de LY 1 mM en medio de transporte.

Medio de cultivo suplementado.

6.1.2 ESTUDIOS *IN VIVO*

6.1.2.1. Reactivos

Agua desionizada.

Fosfato ácido de potasio (J. T. Baker).

Anticoagulante CDP (Citratos-Dextrosa-Fosfato) (Sigma Aldrich).

Éter etílico (J. T. Baker).

6.1.2.2 Materiales

Columna Waters Spherisorb S5 CN column (200 x 4.6 mm)

Cartuchos para extracción sólida Strata C-18 E (50 μ M, 70 A)

Sistema de evaporación con Nitrógeno.

Sistema de filtración para cartuchos de extracción sólida (Manifold)

Bisturí No 10

Sonda metálica de administración gastrointestinal para ratones

Centrífuga para tubos Eppendorf

Refrigerador REVCO de -20 °C

6.1.2.3 Equipo

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Shimadzu con:

Bomba isocrática modelo LC-10AD/VP

Detector ultravioleta-visible modelo SPD-10AVP.

Inyector automático modelo SIL-10 A.

6.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

6.2.1 ESTUDIOS *IN VITRO*

6.2.1.1 Metodología analítica para la cuantificación de los compuestos 1-4, y de los fármacos ABZ, atenolol y propranolol en solución Salina de Hank's

Solución stock de los compuestos 1-4 (10 mM): Se pesó el equivalente a 0.1 mmol de cada uno de los compuestos a evaluar (compuesto 1, 27.5 mg; compuesto 2, 39 mg; compuesto 3, 28.9 mg; compuesto 4, 32.3 mg), se disolvió en una pequeña cantidad de etanol y se aforó a 10 mL con el mismo disolvente.

Solución de trabajo de los compuestos 1-4 (100 μ M): De la solución stock 10 mM del compuesto a evaluar, se tomó 1 mL y se colocó en un matraz aforado de 100 mL, y se aforó con solución de transporte (solución salina de Hank's).

Solución stock de benzoilmetronidazol (BMNDZ) 1.5 mg/mL (estándar interno, EI): Se pesaron 15 mg de BMNDZ y se aforó a 10 mL con etanol. Se transfirió a un tubo de ensaye, se envolvió con papel metálico y se mantuvo en refrigeración (-20 °C).

Solución de trabajo de BMNDZ (150 μ g/mL) como estándar interno para los compuesto 1-4: Se diluyó 1 mL de la solución stock de BMNDZ (1.5 mg/mL) aforando a 10 mL con agua desionizada. El estándar interno se inyectó en el cromatógrafo a una concentración final de 15 μ g/mL.

Solución stock de albendazol (10 mM): Se pesó el equivalente a 0.1 mmol de ABZ (26.5 mg), se disolvió en una pequeña cantidad de dimetilsulfóxido (DMSO) y se aforó a 10 mL con el mismo disolvente.

Solución de trabajo de ABZ (50 μ M): De la solución stock 10 mM de ABZ, se tomaron 0.125 mL y se aforó a 25 mL con solución de transporte (solución salina de Hank's).

Solución de trabajo de BMNDZ (50 μ g/mL) como estándar interno de ABZ: Se diluyeron 0.33 mL de la solución stock de BMNDZ (1.5 mg/mL) aforando a 10 mL con agua desionizada. El estándar interno se inyectó en el cromatógrafo a una concentración final de 5 μ g/mL.

Solución stock de atenolol (10 mM): Se pesó el equivalente a 0.1 mmol de atenolol, se disolvió en una pequeña cantidad de etanol y se aforó a 10 mL con el mismo disolvente

Solución de trabajo de atenolol (100 μ M): De la solución stock 10 mM de atenolol, se tomó 1 mL y se aforó a 100 mL con solución de transporte (solución salina de Hank's).

Solución stock de acetaminofén (EI para atenolol) 1.0 mg/mL: Se pesaron 10 mg de acetaminofén y se disolvieron en una pequeña cantidad de metanol, y finalmente se aforó a 10 mL con el mismo disolvente.

Solución de trabajo de acetaminofén (10 µg/mL) como estándar interno para atenolol: Se diluyeron 100 µL de la solución stock de acetaminofén (1.0 mg/mL) aforando a 10 mL con etanol. El estándar interno se inyecta en el cromatógrafo a una concentración final de 1 µg/mL.

Solución stock de propranolol (10 mM): Se pesó el equivalente a 0.1 mmol de propranolol, se disolvió en una pequeña cantidad de etanol y se aforó a 10 mL con el mismo disolvente.

Solución de trabajo de propranolol (100 µM): De la solución stock 10 mM de propranolol, se tomó 1 mL y se aforó a 100 mL con solución de transporte (solución salina de Hank's).

Solución stock de prazicuantel (EI para propranolol) 1.0 mg/mL: Se pesaron 10 mg de prazicuantel y se disolvieron en una pequeña cantidad de metanol, y finalmente se aforó a 10 mL con el mismo disolvente.

Solución de trabajo de prazicuantel (50 µg/mL) como estándar interno para propranolol: Se diluyeron 500 µL de la solución stock de prazicuantel (1.0 mg/mL) aforando a 10 mL con etanol. El estándar interno se inyecta en el cromatógrafo a una concentración final de 5 µg/mL.

Solución de transporte (solución de Hank's pH 7.4 con D-glucosa 10 mM y HEPES 10 mM): Se pesó el equivalente a 10 mmoles de D-glucosa y Hepes, sal de sodio, y se disolvieron en 700 ml de agua destilada estéril, se adicionaron 100 mL de solución salina de Hank's (10X) y se ajustó el pH de la solución a 7.4 con NaOH o HCl 0.1 N. Para los estudios de permeabilidad, esta solución se esterilizó con membrana de 0.2 µm de poro.

6.2.1.2 Pruebas de Solubilidad

Ácido clorhídrico 0.1 N (100 mL): Se tomaron 0.80 mL de ácido clorhídrico R.A. y se aforó con agua desionizada a 100 mL.

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 (100 mL): Se pesaron 1.38 g de NaH₂PO₄ R.A. previamente secado en estufa y se disolvieron con 80 mL de agua desionizada, se ajustó el pH con HCl o NaOH 0.1 N a 7.4 y se aforó a 100 mL con agua desionizada.

Solución acuosa de lauril sulfato de sodio (LSS) al 1% (100 mL): Se pesó 1 g de LSS, se disolvió con 80 mL de agua desionizada con agitación constante y se aforó a 100 mL con agua desionizada.

Fluido gástrico simulado sin enzimas 1000 mL (FGS): Se pesaron 2 g de NaCl R.A. y se adicionaron 7 mL de HCl R.A., se aforó con agua desionizada a 1000 mL. (pH aproximado de 1.2) (FEUM, 7ª Edición, 2000).

Fluido intestinal simulado sin enzimas (FIS):

Preparación previa de NaOH 0.2 N: Se pesó 1.64 g de NaOH R.A. y se disolvió en 200 mL de agua desionizada.

Para la preparación de FIS se pesaron 6.8 g de KH_2PO_4 en 250 mL de agua desionizada, se mezcló y se agregó 190 mL de NaOH 0.2 N y 400 mL de agua desionizada, se mezcló y ajustó la solución resultante con solución de NaOH 0.2 N a pH 7.5 ± 0.1 , llevando a 1000 mL con agua desionizada. (FEUM, 7ª Edición, 2000).

Solución salina de Hank's pH 7.4 (D-glucosa 10 mM, HEPES 10 mM, como medio de transporte en estudios de permeabilidad): Ver el numeral 6.2.1.5

6.2.1.3 Determinación de pK_a .

Solución valorada de HCl 0.1 N: Se preparó una solución de HCl 0.1 N utilizando HCl R.A. y agua bidestilada, valorándose con carbonato de sodio (FEUM, 7ª Edición).

Solución valorada de NaOH 0.1 N: Se preparó una solución de NaOH 0.1 N utilizando NaOH R.A. y agua bidestilada, valorándose con biftalato de potasio (FEUM, 7ª Edición).

Preparación de la solución stock de los compuestos 1-4 (2×10^{-4} M): Se pesó el equivalente a 0.01 mmol de cada compuesto a analizar. Se disolvió en 1 mL de metanol G.R. Se verificó que el compuesto estuviera completamente solubilizado. Se aforó a un volumen de 50 mL con agua bidestilada, que no contuviera ninguna especie de sales. Al adicionar agua, se cuidó que no se presentara precipitación del compuesto (concentración final 2×10^{-4} M).

Solución de HCl 0.1 N con NaCl 0.15 M (solución A, 100 mL): Se pesaron 1.17 g de NaCl R.A., se adicionaron 0.80 mL de HCl R.A., se agitó y se aforó a 100 mL con agua bidestilada.

Solución de NaOH 0.1 N con NaCl 0.15 M (solución B, 100 mL): Se pesaron 0.4 g de NaOH R.A., se adicionaron 30 mL de agua desionizada para disolver. Por separado se pesaron 1.17 g de NaCl, y se disolvieron en 30 mL de agua desionizada. Ambas soluciones se mezclaron y se aforó a 100 mL con agua bidestilada.

Solución ácida para titulación, solución A (con compuesto 10^{-5} M): Se tomaron 10 mL de la solución stock del compuesto en cuestión y se aforó a 100 mL con solución A. El compuesto quedó a una concentración final de 2×10^{-5} M.

Solución básica para titulación, solución B (con compuesto 10^{-5} M): Se tomaron 10 mL de la solución stock del compuesto en cuestión y se aforó a 100 mL con solución B. El compuesto quedó a una concentración final de 2×10^{-5} M.

Preparación del blanco para lecturas de absorción: En un matraz de 50 mL, se adicionó 1 mL de metanol y se aforó con agua bidestilada. De esta solución, se tomaron 10 mL y se diluyó con agua bidestilada a 100 mL. (concentración final de metanol: 0.2 %).

6.2.1.4 Determinación del coeficiente de partición (Log P)

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4: (Ver preparación en Pruebas de Solubilidad).

Solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4 saturada con *n*-octanol: Se tomaron 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos, y se adicionaron 100 mL de *n*-octanol. Se mezclaron vigorosamente durante 10 minutos. Se dejaron reposar durante 24 h hasta que ambas fases se separaron perfectamente. Al finalizar este periodo, se separó con una pipeta Pasteur la fase orgánica, evitando arrastrar fase acuosa. La fase acuosa es la solución amortiguadora saturada con *n*-octanol. La fase orgánica se colocó en un recipiente separado y constituye el ***n*-octanol saturado con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7.4**

Solución de trabajo de los compuestos 1-4, atenolol, propranolol (concentración 100 μ M) y ABZ (50 μ M): Para la determinación de Log P las soluciones de trabajo utilizadas aquí se prepararon conforme al procedimiento indicado en el numeral 6.2.1.5.

6.2.1.5 Determinación de la permeabilidad utilizando las líneas celulares Caco-2 y Madin Darby Canine Kidney (MDCK).

Medio de cultivo DMEM suplementado: Se preparó el medio DMEM con las instrucciones indicadas por el proveedor, se adicionaron los siguientes suplementos: HEPES 25 mM, aminoácidos no esenciales 200 mM, L-glutamina 200 mM, mezcla de antibióticos (penicilina G 10,000 U/mL, estreptomicina 10,000 μ g /mL) y piruvato de sodio 200 mM y 10 % de suero fetal bovino. EL medio preparado se filtró con membrana de 0.2 μ m y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

Preparación del medio de transporte. Se pesó el equivalente a 10 mmoles de D-glucosa y HEPES, sal de sodio, y se disolvió en 700 ml de agua destilada estéril, adicionando 100 mL de solución salina de Hank's 10X y se ajustó el pH de la solución a 7.4. Se esterilizó con membrana de 0.2 μ m de poro.

Solución de trabajo de los compuestos 1-4, atenolol, propranolol (100 μM) y ABZ (50 μM):

Los compuestos a ensayar se prepararon como se indica en el numeral 6.2.1.5.

Preparación de una solución de lucifer yellow (LY) 1 mM. : Se preparó una solución 1mM de LY en medio de transporte (25 mg de LY en 54 mL de solución de transporte). Se esterilizó la solución con un filtro con membrana estéril de 0.2 μm de poro.

6.2.2 ESTUDIOS *IN VIVO*: FARMACOCINÉTICA DEL COMPUESTO 1 EN RATONES Balb/C

Solución de compuesto 1 y compuesto 6 (sulfona de compuesto 1) (2 $\mu\text{g/mL}$). Se pesaron 10 mg de cada compuesto y se diluyeron en 10 mL de etanol. De cada stock se tomaron 100 μl y se diluyeron a 10 mL, con agua (concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$). De esta segunda solución se tomaron 0.4 mL y se diluyeron a 2 mL con HCl 0.01 M para evaluación del Sistema y con plasma humano o de ratón para evaluación del Método quedando a una concentración final de 2 $\mu\text{g/mL}$.

Solución de compuesto 5 (sulfóxido de compuesto 1) (5 $\mu\text{g/mL}$). Se pesaron 10 mg de de compuesto 5 y se diluyó en 10 mL de etanol. De este stock se tomaron 100 μl y se diluyeron a 10 mL, con agua (concentración final de 10 $\mu\text{g/mL}$). De esta segunda solución se tomaron 1.0 mL y se diluyeron a 2 mL con HCl 0.01 M para evaluación del Sistema y con plasma humano o de ratón para evaluación del Método quedando a una concentración final de 5 $\mu\text{g/mL}$.

Solución de compuesto 3 (20 μM). Se pesó un equivalente a 0.1 mmol del compuesto 3 (28.9 mg) y se diluyó en 10 mL de etanol. Del stock de 10 mM se tomaron 100 μL y se diluyó a 10 mL con agua (100 μM). De esta segunda solución se tomaron 2 mL y se diluyeron a 10 mL con ácido clorhídrico al 10 % para una concentración final de 20 μM , la cual se utilizó como Estandar Externo.

Solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M pH 6.0

Se pesaron 1.36 g de fosfato monobásico de potasio, se diluyeron en 800 mL de agua desionizada, se ajustó el pH de la solución con NaOH 1 M, y se aforó a 1 L.

Solución de HCl 0.01 M. En un matraz volumétrico de 100 mL se adicionaron con precisión 100 μL de HCl concentrado, aforando con agua. Se utilizó HCl 0.01 M para el aforo de las muestras en solución en cada curva para sistema.

6.3 METODOLOGÍA

6.3.1 ESTUDIOS *IN VITRO*

6.3.1.1 Método analítico para la cuantificación de los compuestos 1-4, y los fármacos ABZ, atenolol y propranolol en solución salina de Hank's

6.3.1.1.1 Desarrollo de los métodos de cuantificación utilizados

Para la cuantificación de los compuestos se utilizó cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección ultravioleta. Los métodos para los compuestos 1-4 y ABZ se describen a continuación. Los métodos utilizados para cuantificar atenolol y propranolol (estándar de baja y alta permeabilidad respectivamente) fueron descritos en la Farmacopea de los Estados Unidos (USP XXVI, 2002).

6.3.1.1.2 Fase móvil utilizada en los métodos de cuantificación

En la Tabla 7 se presentan las fases móviles utilizadas para los diferentes compuestos analizados en el estudio.

Tabla 7. Fase móvil utilizada para la cuantificación de los compuestos evaluados

Compuesto	Fase
1	Metanol: agua 60:40
2	Metanol: agua 60:40
3	Metanol: agua 60:40
4	Metanol: agua 60:40
ABZ	Metanol: sol. amortiguadora de fosfatos pH 5.5 0.01 M
Atenolol	Solución acuosa (Na ₂ HPO ₄ 0.1 % p/v, heptansulfonato de sodio 0.15 % p/v, dibutilamina 0.3 % v/v) pH 3 : Metanol 70:30.
Propranolol	Solución acuosa (Lauril sulfato de sodio 0.70 % p/v, H ₃ PO ₄ 0.04M): ACN:Metanol 280:360:360

6.3.1.1.3 Curvas de calibración y puntos control.

La curva de calibración de los compuestos 1-4, atenolol y propranolol y los puntos control utilizados se prepararon de acuerdo a la Tabla 8 y para ABZ, conforme a la Tabla 9.

Tabla 8. Curva de calibración para la cuantificación para los compuestos 1-4, atenolol y propranolol

Vol. de solución 100 µM (mL)	Aforo con solución de Transporte (mL)	Concentración µM	Observaciones
0.01	10	0.1	
0.03	10	0.3	
0.05	10	0.5	
0.08	10	0.8	
0.1	10	1	
0.5	10	5	
1.0	10	10	
2.5	10	25	
5.0	10	50	
7.5	10	75	
10	10	100	

0.15	10	1.5	Punto control
3.0	10	30	Punto control
6.0	10	60	Punto control
9.0	10	90	Punto control

Tabla 9. Curva de calibración para la cuantificación para ABZ

Vol. de solución 50 µM (mL)	Aforo con solución de Transporte (mL)	Concentración µM	Observaciones
0.02	10	0.1	
0.06	10	0.3	
0.10	10	0.5	
0.16	10	0.8	
0.20	10	1	
1.0	10	5	
2.0	10	10	
5.0	10	25	
10.0	10	50	
0.30	10	1.5	Punto control
3.0	10	15	Punto control
6.0	10	30	Punto control

6.3.1.1.4 Adición del Estándar Interno

Para cada uno de los compuestos analizados:

De cada nivel de concentración de las curvas preparadas se tomaron 0.9 mL, se colocaron en un vial y se adicionaron 100 µL de solución del estándar interno respectivo. Los viales se agitaron en vórtex durante 30 segundos.

6.3.1.1.5 Análisis Cromatográfico

De cada uno de los compuestos a analizar se prepararon curvas y se inyectaron al cromatógrafo con las condiciones indicadas en la Tabla 10.

Tabla 10. Condiciones cromatográficas para la cuantificación de los compuestos evaluados en los estudios de permeabilidad.

Compuesto	Columna	Flujo (mL/min)	Longitud de onda (nm)	Volumen de inyección (µL)	Fase móvil	Estándar Interno
1	Symetry 3.9 x 10 mm	1	304	100	Metanol:agua 60:40	BZMDZ 15 µg/mL.
2	Symetry 3.9 x 10 mm	1	304	100	Metanol:agua 60:40	BZMDZ 15 µg/mL.
3	Symetry 3.9 x 10 mm	1	304	100	Metanol:agua 60:40	BZMDZ 15 µg/mL.
4	Symetry 3.9 x 10 mm	1	304	100	Metanol:agua 70:30	BZMDZ 15 µg/mL.
ABZ	Hypersyl 125 x 4.6 mm 5µm	1	294	100	Metanol:fosfatos pH 5.5 (0.01N) 60:40	BZMDZ 5 µg/mL.
Atenolol	Zorbax 4.6 x 150 mm 5 µm	1	224	20	Solución acuosa (Na ₂ HPO ₄ 0.1 % p/v, heptansulfonato de sodio 0.15 % p/v, dibutilamina 0.3 % v/v) pH 3 : metanol	Acetaminofén 1.0 µg/mL

					70:30.	
Propranolol	Novapack 4.6 x 150 mm 5µm	1	220	50	Solución acuosa (lauril sulfato de sodio 0.70 % p/v, H ₃ PO ₄ 0.04M): ACN:metanol 280:360:360	PZQ 5 µg/mL

Se determinó la concentración estimando la relación de áreas de la muestra entre el estándar interno

6.3.2 VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Para la validación de los métodos de cuantificación de cada uno de los compuestos bajo estudio se utilizó la Norma Oficial Mexicana NOM –177-SSA1-1998. Se determinaron los siguientes parámetros de desempeño:

- a) Adecuabilidad del Sistema
- b) Selectividad
- c) Linealidad
- d) Precisión
 - a. Repetibilidad
 - b. Reproducibilidad
- e) Exactitud
- f) Límite de Detección (LD)
- g) Límite de Cuantificación (LQ)
- h) Estabilidad (evaluada únicamente para el método en los estudios *in vivo*).

6.3.2.1 Preparación de puntos control

Se prepararon por quintuplicado muestras a tres niveles de concentración dentro del intervalo de la curva de calibración para cuantificación de cada compuesto conforme se indica en la Tabla 8 y 9 para los compuestos evaluados.

6.3.2.1 Adecuabilidad del Sistema

Se preparó una solución del estándar interno utilizado y se inyectó por lo menos 5 veces en las condiciones de análisis por CLAR para cada compuesto, posteriormente se determinó el promedio de la respuesta (Áreas), la desviación estándar respectiva y el

coeficiente de variación porcentual (CV %). La prueba de adecuabilidad se aprobó antes de iniciar cada corrida, siempre que el coeficiente de variación fuera menor al 2 %.

6.3.2.2 Selectividad

Se corrió una serie de inyecciones en las condiciones cromatográficas para cada compuesto a analizar en concentración de 100 μM , considerando el orden indicado en la Tabla 11.

Tabla 11. Secuencia de inyecciones para evaluar la Selectividad de los métodos de cuantificación.

Corrida No.	No. de Repeticiones	Solución a inyectar
1	2	Blanco de disolvente (Solución de Hank's)
2	2	Solución del compuesto a analizar
3	2	Solución del Estándar Interno

Se determinó el tiempo de retención para cada compuesto o señal en el cromatograma, y se verificó que ninguna otra señal interfiriera con el compuesto de interés.

6.3.2.3 Linealidad

Para la evaluación de la linealidad de cada método de cuantificación, se prepararon 3 curvas de calibración de cada uno de los compuestos en el rango de concentraciones indicado en el apartado 6.3.1.1.3 y se analizaron de acuerdo a lo descrito en el 6.3.1.1.5. El criterio de aceptación fue un coeficiente de correlación mayor a 0.99. La operación se repitió por 3 días.

6.3.2.4 Precisión

i) Repetibilidad

Para evaluar la repetibilidad se determinó el promedio de la concentración a cada nivel de concentración de los puntos control respectivos, desviación estándar y su coeficiente de variación porcentual (CV %). El procedimiento se repitió por 3 días. Se consideró repetible si a cada nivel:

$$\text{CV \%} < 3 \%$$

Para muestras biológicas $\text{CV \%} < 15 \%$.

ii) Reproducibilidad

Con el total de las evaluaciones para repetibilidad durante los tres días, se calculó el CV % a cada nivel de concentración.

Se consideró reproducible si a cada nivel:

$$\text{CV \%} < 3 \%$$

Para muestras biológicas $\text{CV \%} < 15 \%$.

6.3.2.5 Exactitud

Se evaluó la exactitud como % de recobro. Se consideró exacto el método si el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad estuvo dentro del $\pm 15\%$ del valor nominal de concentración.

6.3.2.6 Límite de detección (LD)

Se determinó la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz biológica se podía distinguir de los niveles de ruido. Dicha señal debió ser al menos 3 veces mayor al nivel de ruido determinado.

6.3.2.7 Límite de cuantificación (LC)

El Límite de Cuantificación se determinó analizando por quintuplicado la concentración más baja del intervalo de trabajo. Se consideró válida si el promedio se encontraba en el intervalo de $\pm 20 \%$ del valor nominal y el CV % fue menor al 20 %.

6.3.2.8 Estabilidad (evaluada para la cuantificación de los compuestos 1, 5 y 6 en los estudios *in vivo*).

La evaluación de la estabilidad de las muestras se realizó verificando las siguientes condiciones:

a) Estabilidad a temperatura ambiente (12 y 24 h).

Se preparó por triplicado una serie de puntos control y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 12 y 24 horas. Los valores de respuesta se interpolaron en una curva

de calibración preparada el día de análisis. Se determinó la cantidad recuperada promedio de los puntos control, la desviación estándar, y el coeficiente de variación.

b) Ciclos Congelación-Descongelación (2 ciclos).

Se preparó por triplicado una serie de puntos control a 3 niveles de concentración, se congelaron completamente a temperatura de refrigeración, se sacaron del congelador, se descongelaron (ciclo congelación-descongelación), se repitió la operación una vez más (2 ciclos). Las muestras se cuantificaron en una curva preparada el día del análisis, se determinó el promedio de la concentración recuperada de los puntos control, la desviación estándar, el coeficiente de variación y el % de recobro a cada nivel de concentración.

c) Estabilidad a temperatura de refrigeración (-4 °C).

Se preparó por triplicado una serie de muestras control a 3 niveles de concentración y se dividieron en 3 series. Una serie se analizó el mismo día de preparación, interpolando los valores de las respuestas del análisis en una curva de calibración preparada en ese mismo día y se considero como los valores de tiempo cero. Las otras series se mantuvieron en refrigeración (4°C) durante 24 y 48 h y sus correspondientes valores de respuesta se interpolaron en una curva preparada el mismo día de análisis. Se determinó el promedio de la concentración recuperada, desviación estándar, CV % y el % de recobro a cada nivel de concentración.

d) Estabilidad a temperatura de congelación (-20 °C).

Se preparó por triplicado una serie de muestras control a 3 niveles de concentración y se dividieron en 3 series. Una serie se analizó el mismo día de preparación, interpolando los valores de las respuestas del análisis en una curva de calibración preparada en ese mismo día y se considero como los valores de tiempo cero. Las otras series se mantuvieron en congelación (-20°C) durante 7 y 30 días y sus correspondientes valores de respuesta se interpolaron en una curva preparada el mismo día de análisis. Se determinó el promedio de la concentración recuperada, desviación estándar, CV % y el % de recobro a cada nivel de concentración.

Se consideró estable la muestra en todos los casos si se cumple con los criterios de precisión y exactitud mencionados en los apartados respectivos.

6.3.3 DETERMINACIÓN DE LA SOLUBILIDAD

6.3.3.1 Estudios preliminares de cada uno de los compuestos a evaluar

Se pesaron de 2 a 3 mg de cada uno de los compuestos y se adicionaron alícuotas de disolvente en volúmenes de 50-100 μL cada vez, agitando en vórtex e inspeccionando la presencia de partículas de muestra. Se adicionó disolvente hasta alcanzar la disolución completa de la muestra pesada.

6.3.3.2 Estudios de solubilidad en agua

La solubilidad de cada compuesto se determinó de acuerdo al método reportado por Yalkowski y cols. (1983). A tubos Eppendorf conteniendo 10 mg de compuesto se les adicionó 1 mL de agua desionizada, y se mantuvieron en agitación a 25 ° C por 24 horas. Después de este periodo, la muestra se filtró con una membrana de nylon de poro de 0.45 μm y se cuantificaron por CLAR.

6.3.4 DETERMINACIÓN DE pKa

6.3.4.1 Determinación del espectro de absorción ultravioleta de los compuestos 1-4 a diferentes valores de pH

Se colocó la solución A (sección 6.2.1.3) en un vaso con agitador magnético. Se introdujo el electrodo del potenciómetro en la solución A, se dejó equilibrar el sistema y se tomó el pH inicial. Se colocó la solución B (sección 6.2.1.3) en el recipiente del titulador Titrimo. Se comenzó a titular la solución A con la solución B, adicionando pequeñas cantidades con el titulador, hasta lograr un cambio de 0.5 unidades de pH, se tomó una alícuota de 5 mL y se repitió la operación, tomando muestras cada 0.5 unidades de pH de variación hasta alcanzar el pH máximo. Se cubrieron las muestras y se dejaron reposar durante 4 h. Al finalizar este periodo, se leyó nuevamente el pH. Se obtuvieron los espectros de absorción de cada muestra tomada en la región ultravioleta manteniendo las muestras a 25 °C.

Con los espectros de absorción de todas las muestras graficados en un solo cuadrante, se localizaron al menos 5 longitudes de onda analíticas (Albert y Serjeant, 1971). Se graficaron las absorbencias vs pH a cada longitud analítica y se determinó el valor de pKa utilizando el software Origin (Origin ver. 4.1, Microal Inc., Ma, USA) realizando el ajuste con la siguiente ecuación:

$$A_{\text{obs}} = [A_i + A_m(10^{\text{pH}-\text{pKa}})] / (1 + 10^{\text{pH}-\text{pKa}}) \dots\dots\dots \text{Ecuación 1}$$

Donde A_{obs} , A_i , y A_m son las absorbencias observadas, de la especie neutra y la absorbencia de las formas iónicas respectivamente. Adicionalmente se realizó un ajuste de las lecturas espectrofotométricas con el software pHab (Protonic Software, Hyperquad Co. U.K.) (Gans et al., 1999).

6.3.5 DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN (Log P) Y CÁLCULO DE Clog P

En tubos Eppendorf, se colocaron por triplicado, 0.2 mL de la solución de los compuestos **1-4**, atenolol y propranolol (100 μ M) o el ABZ (50 μ M) y 1.8 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 saturada con n-octanol. Se adicionaron 2 mL de n-octanol saturado con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4. Cada tubo se agitó vigorosamente en vórtex durante 40 minutos. Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 30 minutos, se separó la fase orgánica y la fase acuosa y se realizó la cuantificación del compuesto en ambas fases mediante cromatografía de líquidos.

La determinación del Coeficiente de Partición, como Log P se realizó mediante la siguiente función:

$$\text{Log P} = \log ([\text{fármaco}]_o / [\text{fármaco}]_{aq}) \dots \text{Ecuación 2}$$

donde $[\text{fármaco}]_o$ es la concentración del compuesto en la fase orgánica y $[\text{fármaco}]_{aq}$ es la concentración del compuesto en la fase acuosa. Adicionalmente se determinó el valor de Clog P con el software ACDLAB (ACD Labs System).

6.3.6 EVALUACIÓN DE LA PERMEABILIDAD RELATIVA DE LOS COMPUESTOS UTILIZANDO LAS LÍNEAS CELULARES CACO-2 Y MADIN DARBY CANINE KIDNEY (MDCK)

6.3.6.1 Proliferación de Células

Las líneas celulares Caco-2 y MDCK se proliferaron utilizando el medio de cultivo DMEM suplementado con 10 % de SFB a 37 °C, 95 % de humedad relativa y 5 % de CO₂.

6.3.6.2 Preparación de celdas transwell con colágena de rata tipo I

Las celdas transwell utilizadas fueron recubiertas previamente con colágena de rata tipo I, (concentración de 0.9 mg/mL en solución de ácido acético 0.2 % y etanol absoluto). Cada celda transwell de 1.1 cm² se recubrió con 200 µL de esta solución.

6.3.6.3 Preparación del cultivo celular en las celdas transwell

En cada celda transwell se colocaron 60,000 células en la parte apical y se incubaron a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de H.R. Para la línea celular Caco-2 se cambió el medio cada 48 horas hasta el día 8, y posteriormente cada día hasta el día 28 en que se encontraba listo el cultivo para ser utilizado para el ensayo de permeabilidad. Para la línea celular MDCK, el medio se cambió diariamente durante 6 días, periodo en el cual se encontraba listo para el estudio de permeabilidad.

6.3.6.4 Medición de Resistencia Transepitelial (TEER)

Cuando las capas de células estuvieron listas (28 días para las células Caco-2 y 6 días para las células MDCK) se midió la TEER utilizando un voltímetro EVOM (World Precision Instruments, Sarasota, FL.) y cambiando previamente el medio DMEM por solución de transporte (solución de Hank's pH 7.4). Se midió de la misma forma la resistencia de una celda con colágena sin células. La resistencia transepitelial de la membrana celular fue la diferencia de la resistencia de la celda con células menos la resistencia de la celda sin células. Una resistencia mayor a 200-250 Ω cm² se considera óptima.

6.3.6.5 Estudio de Permeabilidad de los compuestos 1-4, atenolol, propranolol y ABZ

6.3.6.5.1 Transporte Apical-Basolateral (A-B): En la parte apical de la celda se colocaron 0.5 mL de la solución de trabajo de cada compuesto (sección 6.2.1.1) y en la parte basolateral 1.5 mL de medio de transporte fresco a 37 °C. La placa se mantuvo en agitación en un agitador orbital a 70 rpm y a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de H.R. La celda se cambió a un nuevo pozo con medio de transporte nuevo cada 15 minutos durante todo el estudio. Se realizó el muestreo del fármaco transportado en la parte basolateral a los 15, 30, 45, 60 y 90 minutos. Cada ensayo se realizó por triplicado. Al finalizar el estudio de transporte se verificó la integridad de la membrana celular.

6.3.6.5.2 Transporte basolateral-apical (B-A): Se adicionaron 1.5 mL de la solución de trabajo de cada compuesto (ver sección 6.2.1.1) en la parte basolateral y en la parte

apical 0.5 mL de medio de transporte nuevo a 37 °C. La placa se mantuvo en agitación en un agitador orbital a 70 rpm y a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de H.R. Se realizó el muestreo del fármaco transportado en la parte apical a los 15, 30, 45, 60 y 90 min, tomando una muestra de 200 µL y reponiendo el volumen con medio de transporte nuevo. Cada ensayo se realizó con tres celdas. Al finalizar el estudio de transporte se verificó la integridad de la membrana celular.

La permeabilidad relativa en las líneas celulares se determinó mediante la ecuación 3:

$$P_{app} = dC/dt \times V/AC_0 \dots \dots \dots \text{ Ecuación 3}$$

Donde

P_{app} : Permeabilidad relativa aparente del compuesto en estudio

dC: Cantidad de compuesto transportado en el intervalo de tiempo establecido.

dt: Tiempo que duró el estudio de transporte, en segundos.

V: Volumen del lado receptor.

A: Área de difusión, a través de la celda transwell.

C₀: Concentración inicial del compuesto en estudio.

6.3.6.6 Verificación de la integridad de membrana con LY

Para verificar la integridad de las membranas celulares durante el ensayo, se adicionó 0.5 mL de la solución de LY (1 mM) y 1.5 mL de medio de transporte nuevo en la parte basolateral. La placa con todas las celdas se mantuvo en agitación a 70 rpm y a 37 °C, 5 % de CO₂ y 95 % de H.R. Después de un periodo de 60 min se tomó una muestra de cada celda de la parte basolateral y se colocó en una placa para lectura por fluorimetría (FLUORONUNC). Se determinaron las concentraciones de LY utilizando un espectrofotómetro de fluorescencia (Fluoroscan Ascent, Labsystems, USA) a una longitud de onda de 485 nm de excitación y de emisión de 538 nm. Se consideraron adecuadas las celdas en las cuales el LY presentó un valor de 10⁻⁷ cm/seg.

6.4 ESTUDIO *IN VIVO*

6.4.1 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DEL COMPUESTO 1 EN RATONES Balb/C

6.4.1.1 Método de cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos compuesto 5 y 6 en plasma de ratón

Las concentraciones de las curvas de cuantificación para cada compuesto evaluado se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12. Curvas de cuantificación del compuesto 1 y sus metabolitos compuesto 5 y 6.

Solución	Compuesto 1	Compuesto 5	Compuesto 6
	ng/mL	ng/mL	ng/mL
A	9.375	19.53	9.375
B	18.75	39.06	18.75
C	37.5	78.13	37.5
D	75	156.25	75
E	150	312.50	150
F	300	625.00	300
G	600	1250.00	600
Puntos control			
H	50	50	50
I	100	600	100
J	400	1000	400

La preparación de la curva se realizó como se indica en la Tabla 13, utilizando las soluciones preparadas como se indica en la sección 6.2.2

Tabla 13. Preparación de la curva para cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos compuesto 5 y 6.

Solución	Solución de compuesto 1 (2 µg/mL) µL	Solución de compuesto 6 (2 µg/mL) µL	Solución de compuesto 5 (5 µg/mL) µL	Tomar		**Aforo con HCl 0.01 M y/ó plasma µL
				µL	de	
A	600	600	500			2000
B				1000	Sol A	2000
C				1000	Sol B	2000
D				1000	Sol C	2000
E				1000	Sol D	2000
F				1000	Sol E	2000
G				1000	Sol F	2000
Preparación de los Puntos Control						
H	50	50	20			2000
I	100	100	240			2000
J	400	400	400			2000

**Aforo para Sistema: HCl 0.01 M Aforo para método: Plasma.

Después de aforar, se tomaron 950 µL de las soluciones A-G colocándolas en un nuevo tubo Eppendorf, y se adicionaron 50 µL de la solución de compuesto 3 (Estándar

Externo, 20 μM) para obtener una concentración final de 1 μM de compuesto **3** en cada solución.

6.4.1.2 Método de extracción

Para el análisis de las muestras en plasma, se utilizó un proceso de extracción en fase sólida. Una vez acondicionados los cartuchos con 2 mL de metanol HPLC, cada cartucho se equilibró con una solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0, se adicionaron 250 μL de muestra plasmática y se lavaron con 2 mL de agua desionizada. Las muestras se eluyeron con 2 mL de metanol. Las muestras se evaporaron a sequedad a 55 $^{\circ}\text{C}$ bajo atmósfera de nitrógeno, se reconstituyeron con 125 μL de HCl 0.01 M, se agitaron en vórtex durante 90 segundos y se inyectaron 50 μL al cromatógrafo.

6.4.1.3 Condiciones cromatográficas

Para analizar las muestras preparadas, se utilizó una columna Waters Spherisorb SCN 200 x 4.6 mm de 5 μm , una fase móvil de ACN: solución amortiguadora de fosfatos pH 6.0 (0.01 M) 7:93, con una velocidad de flujo de 1 mL/min, se inyectaron 50 μL y la detección se realizó a 294 nm.

6.4.1.4 Validación del método de cuantificación en plasma humano

La validación del método de cuantificación se realizó utilizando plasma humano, con la finalidad de evitar sacrificar un gran número de animales experimentales. La metodología para esta validación se encuentra descrita en la sección 6.3.2

6.4.1.5 Validación parcial del método de cuantificación del compuesto 1 en plasma de ratón

Se evaluó la linealidad, precisión, exactitud así como la estabilidad del método de cuantificación simultánea del compuesto **1** y sus metabolitos compuesto **5** (sulfóxido) y compuesto **6** (sulfona) en plasma de ratón. Posteriormente se realizó una comparación del desempeño del método de cuantificación en plasma humano y en plasma de ratón.

6.4.2 PROTOCOLO DEL ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DEL COMPUESTO 1 EN RATONES Balb/C

6.4.2.1 Estudio Preliminar

Este estudio preliminar sirvió para establecer los tiempos de muestreo adecuados para el estudio final. Se utilizaron ratones Balb/C machos con un peso de $25 \text{ g} \pm 2 \text{ g}$ y de 6-8 semanas de edad, los cuales tuvieron acceso a alimentación y agua. Se verificó que no estuvieran enfermos y se dividieron en 2 grupos de 14 animales, asignándose el grupo al azar. Los ratones utilizados en el estudio se manejaron respetando las normas internacionales para la Investigación Biomédica y la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 referente al manejo de animales de laboratorio.

6.4.2.2 Administración de la Solución del Compuesto 1.

Se pesaron 60 mg de compuesto **1**, se adicionaron 5 mL de etanol y se aforó a 20 mL con agua destilada para una concentración final de 3 mg/mL. Se administraron 200 μL de la solución por vía oral mediante una jeringa de insulina graduada y una sonda metálica esofagogástrica para ratones, procurando que el líquido llegará directamente al estómago. Se tomaron muestras de la vena yugular a los siguientes tiempos: 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 24.0 h. La sangre se colectó en tubos Eppendorf conteniendo 300 μL de anticoagulante CPDA (Sigma Aldrich). Las muestras sanguíneas se agitaron y centrifugaron a 2000 r.p.m durante 20 min y se procedió a la separación del plasma. Las muestras se congelaron a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta su análisis.

6.4.3 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO FINAL

6.4.3.1 Administración de compuesto 1

Para llevar a cabo el estudio final, se utilizó la misma dosis, y volumen de solución de compuesto **1** que la del estudio preliminar. Las muestras sanguíneas se tomaron a las 0.08 h (5 min), 0.17 h (10 min), 0.25 h (15 min), 0.50 h (30 min), 0.75 h (45min), 1.0 h (60 min), 1.50, 2, 4, 8 h. Se utilizaron 6 ratones por cada tiempo de muestreo.

6.4.3.1 Administración de compuesto 5 (sulfóxido de compuesto 1).

Se pesaron 20 mg de compuesto **5**, se adicionaron 5 mL de etanol y se aforó a 20 mL con agua destilada para una concentración final de 1 mg/mL. Se administraron 200 μL

de la solución por vía oral mediante una jeringa de insulina graduada y una sonda metálica esofagogastrica para ratones, procurando que el líquido llegará directamente al estómago. Las muestras sanguíneas se tomaron a las 0.08 h (5 min), 0.17 h (10 min), 0.25 h (15 min), 0.50 h (30 min), 0.75 h (45min), 1.0 h (60 min), 1.50, 2, 4, 8 h. Se utilizaron 6 ratones por cada tiempo de muestreo.

La sangre se colectó en tubos Eppendorf conteniendo 300 μ L de anticoagulante CPDA (Sigma Aldrich). Las muestras sanguíneas se agitaron y centrifugaron a 2000 rpm durante 20 min y se procedió a la separación del plasma. Las muestras se congelaron a -20 °C hasta su análisis.

7. RESULTADOS

7.1 METODOS *IN VITRO*

7.1.1 VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS 1-4 Y LOS FÁRMACOS ATENOLOL, PROPRANOLOL Y ABZ EN SOLUCIÓN DE HANK'S

Los resultados de validación de cada uno de los compuestos se muestran en la siguiente sección. Cada parámetro evaluado cumplió con los criterios marcados por la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998.

7.1.1.1 Selectividad

La Figura 15 muestra un cromatograma típico de cada uno de los compuestos evaluados, y se puede apreciar que cada señal tanto del compuesto analizado como del estándar interno se encuentran totalmente aisladas y sin interferencias con las señales generadas por la solución salina de Hank's. Los tiempos de retención para cada uno de los compuestos se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Tiempos de retención de los compuestos evaluados.

Compuesto	Tiempo de retención (min)
1	6.25
2	10.78
3	5.77
4	6.42
ABZ	5.22
Atenolol	6.24
Propranolol	4.82

7.1.1.2 Linealidad

En la Figura 16 se muestran las curvas de cuantificación de cada compuesto evaluado; se puede observar que todos los métodos de cuantificación muestran proporcionalidad directa entre la concentración y la respuesta (relación área del compuesto/ área del estándar interno). En cada uno de los métodos el coeficiente de correlación fue mayor a 0.99.

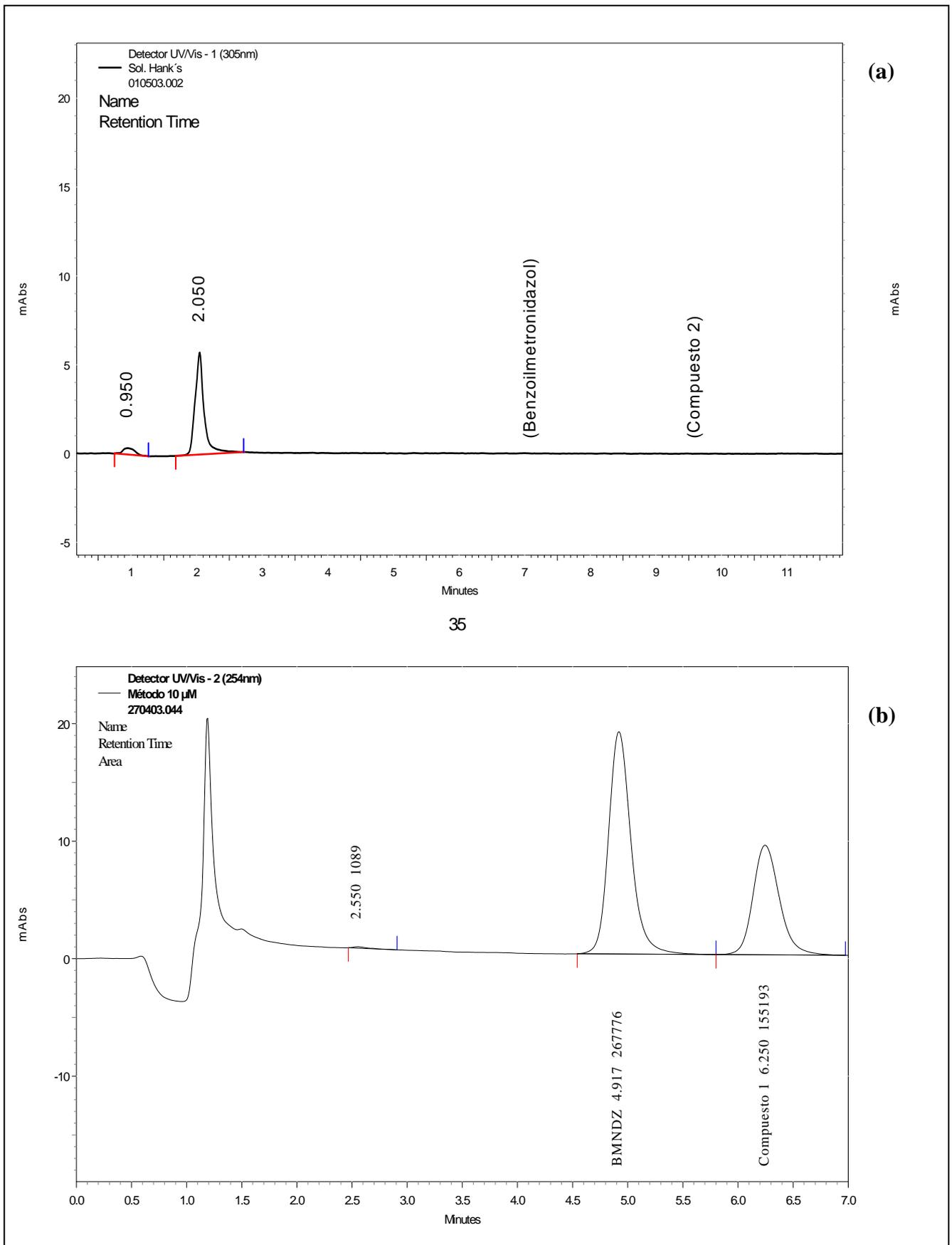


Figura 15. Cromatograma típico de los compuestos evaluados en solución de Hank's. (a) Blanco de Solución de Hank's, (b) Compuesto 1, (c) Compuesto 2, (d) Compuesto 3, (e) Compuesto 4, (f) ABZ, (g) Atenolol, (h) Propranolol.

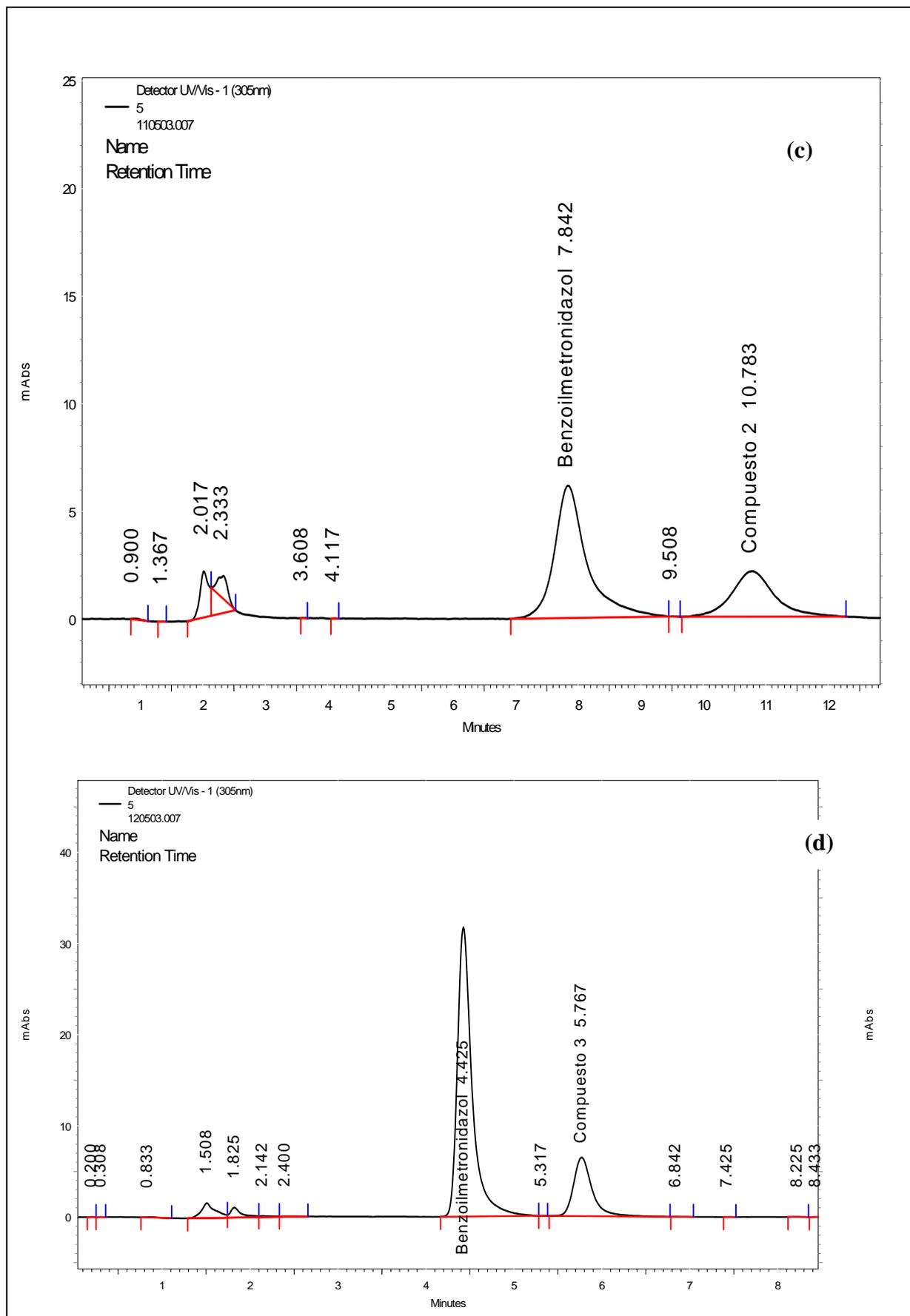


Figura 15. Cromatograma típico de los compuestos evaluados en solución de Hank's. Continuación...

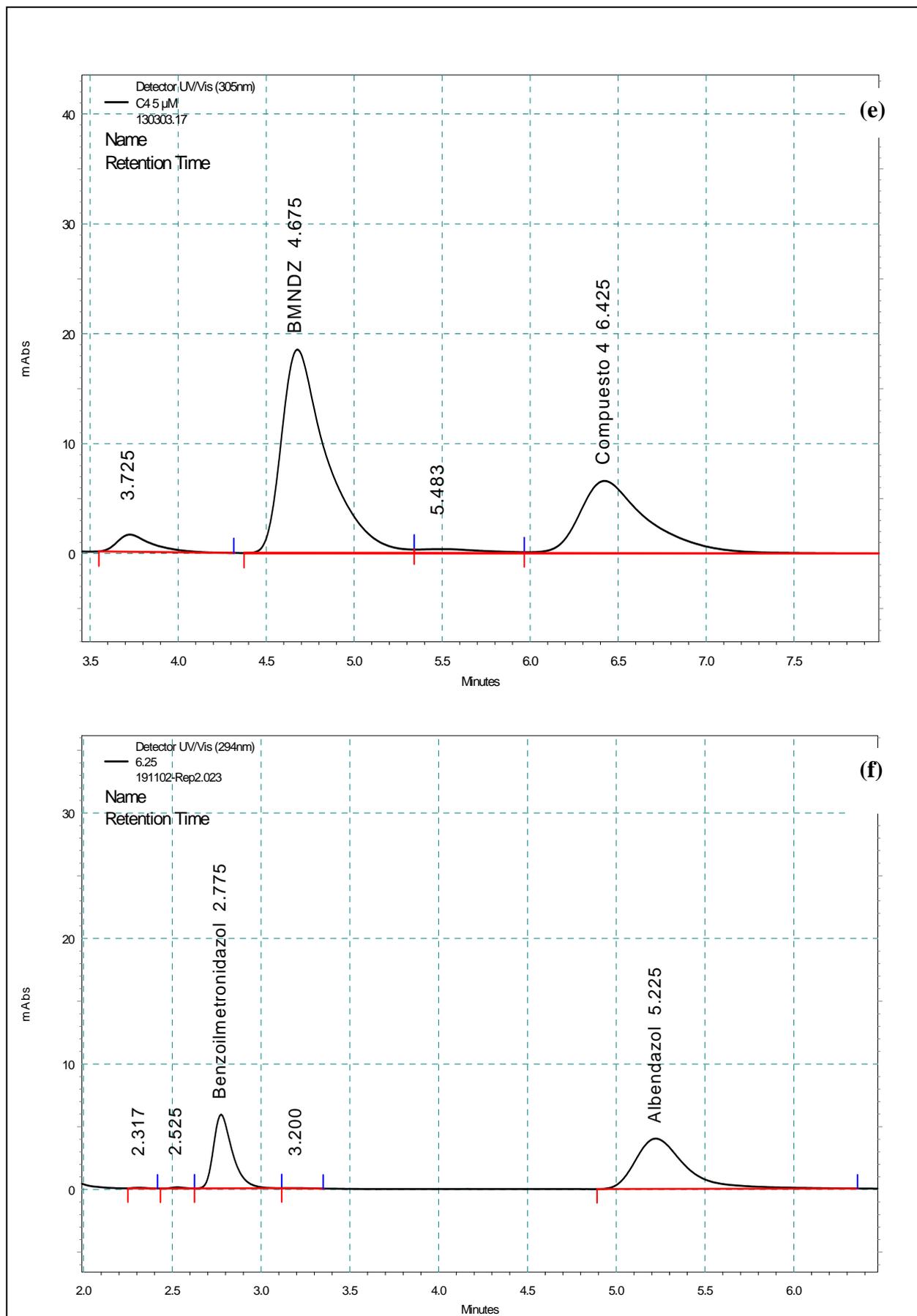


Figura 15. Cromatograma típico de los compuestos evaluados en solución de Hank's. Continuación...

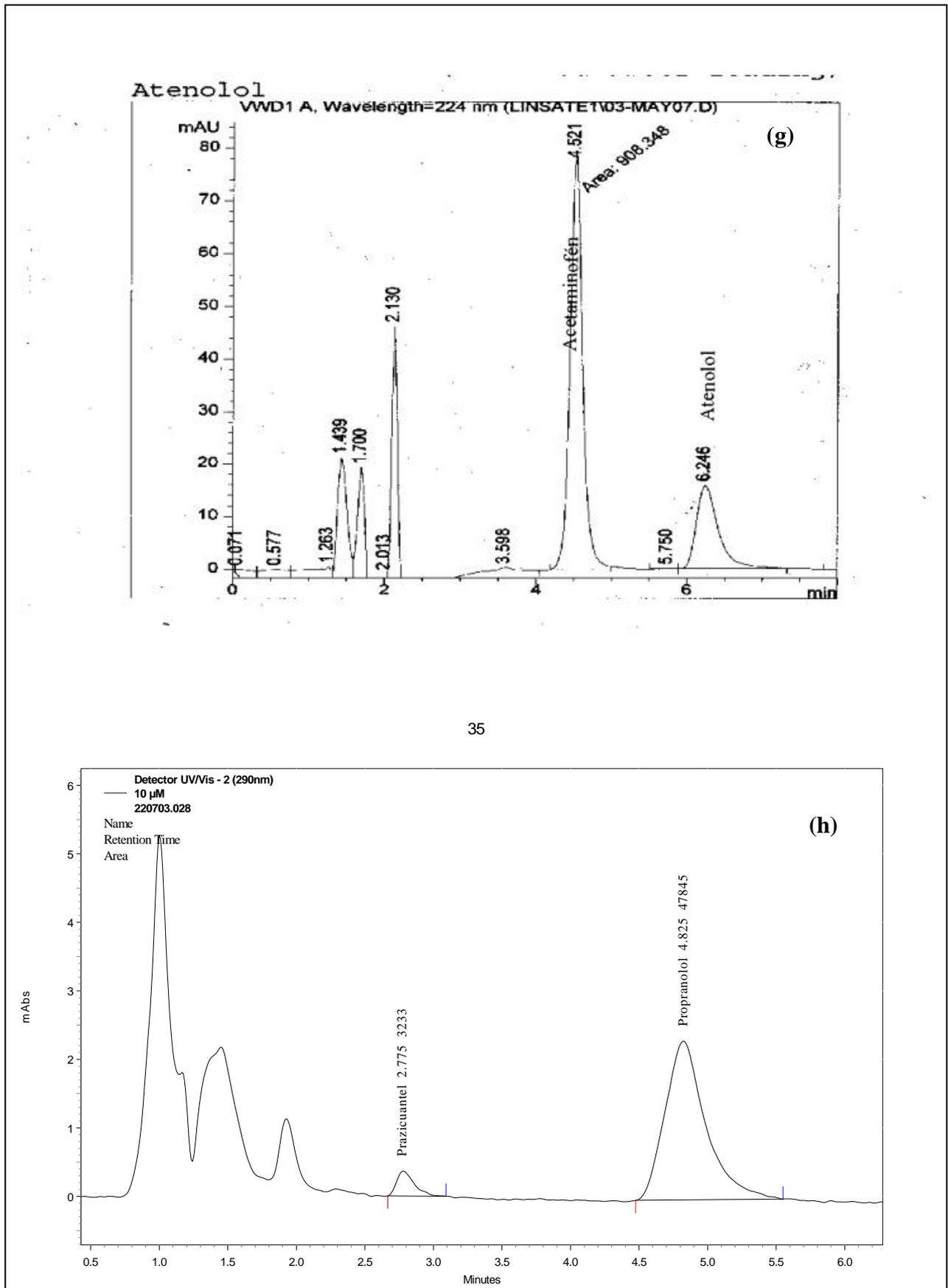
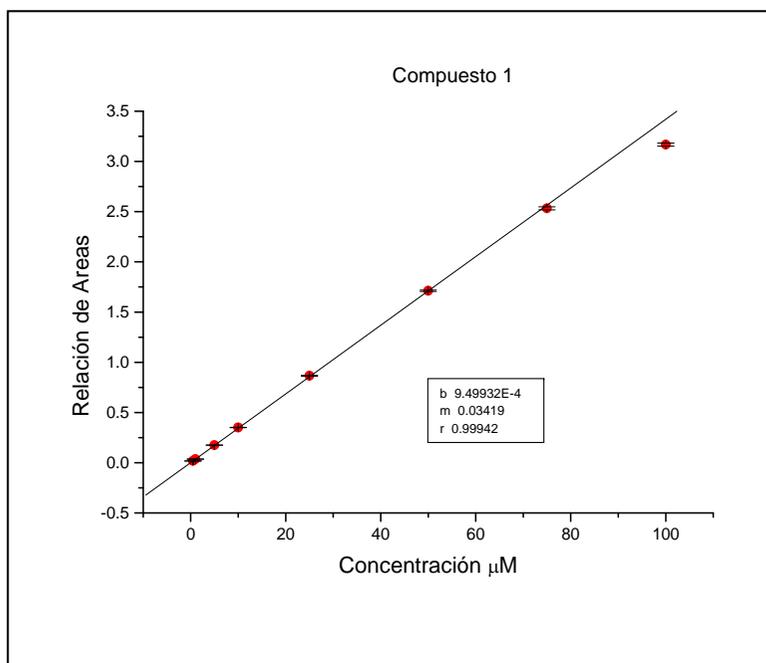
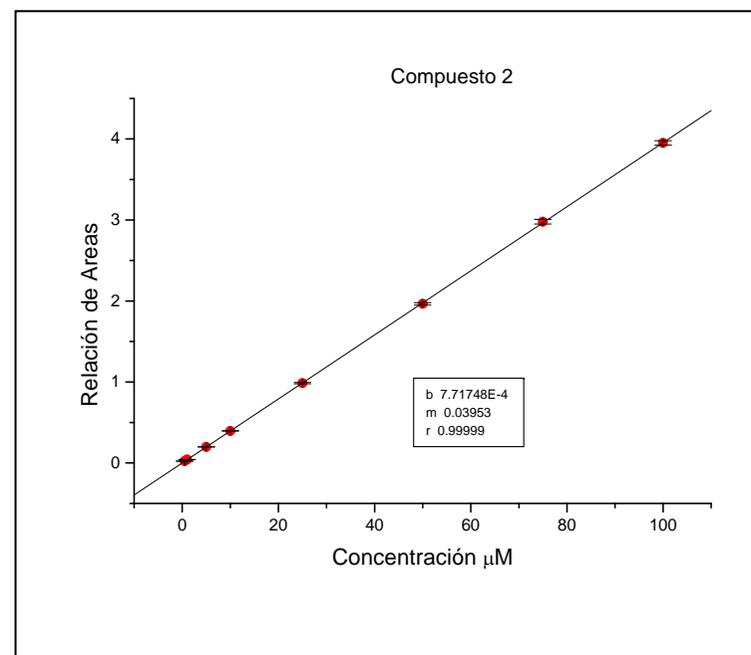


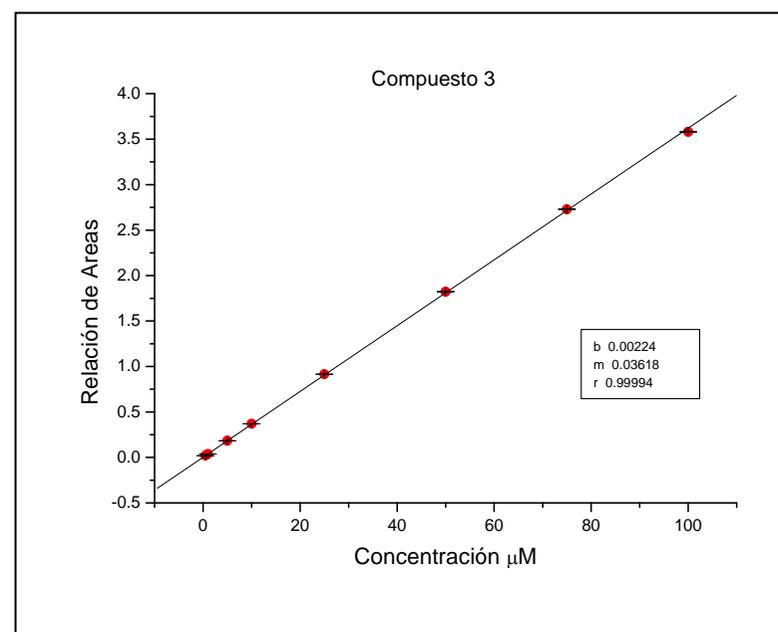
Figura 15. Cromatograma típico de los compuestos evaluados en solución de Hank's. Continuación....



(a)

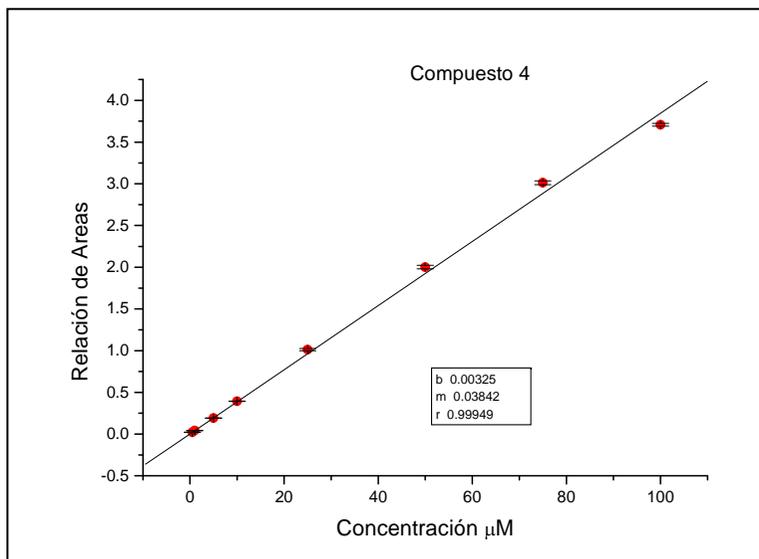


(b)

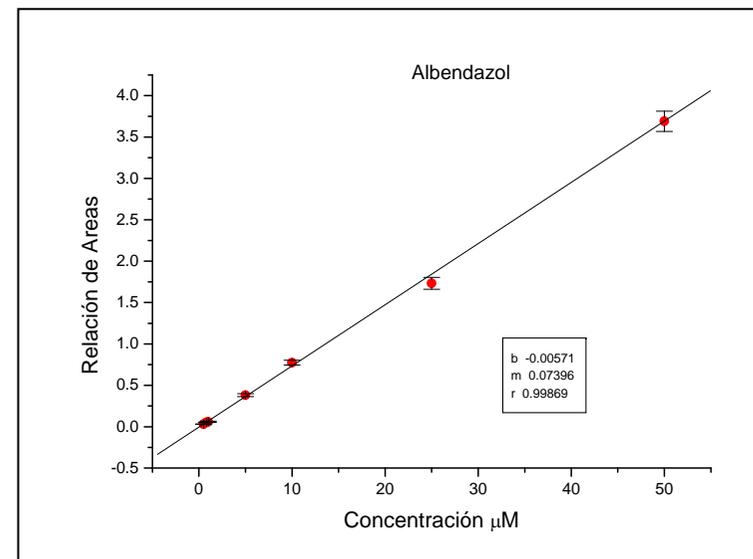


(c)

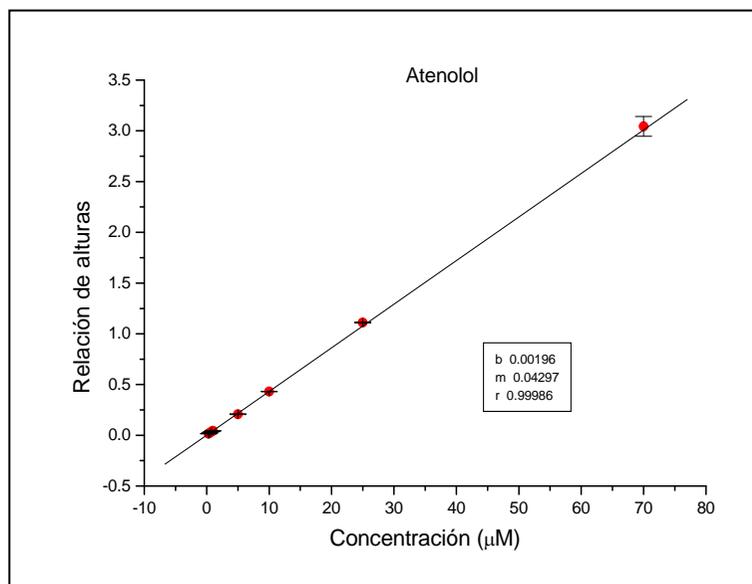
Figura 16 Linealidad del método de cuantificación para los compuestos evaluados. (a) Compuesto 1, (b) Compuesto 2, (c) Compuesto 3, (d) Compuesto 4, (e) ABZ, (f) Atenolol, (g) Propranolol.



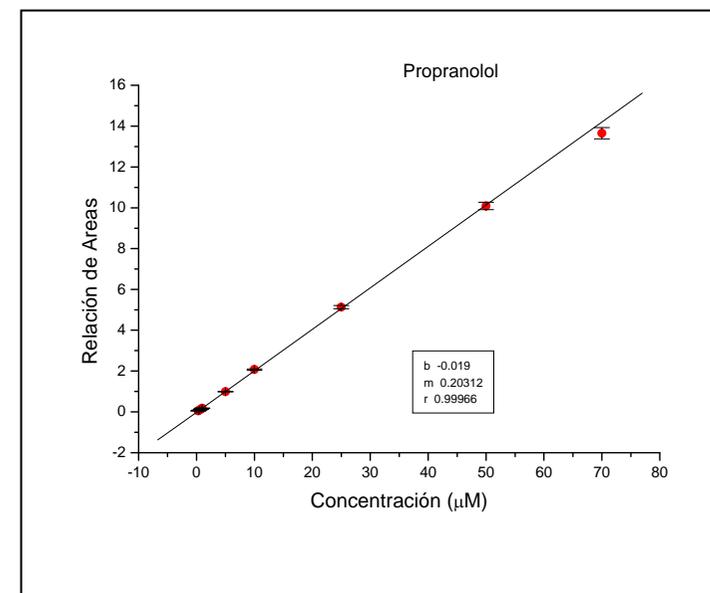
(d)



(e)



(f)



(g)

Figura 16. Continuación...

Los intervalos de trabajo para cada método de cuantificación se encuentran en la Tabla 15.

Tabla 15. Intervalos de cuantificación para los compuestos analizados.

Compuesto	Límite Inferior	Límite Superior
Compuesto 1	0.5 µM	100 µM
Compuesto 2	0.5 µM	100 µM
Compuesto 3	0.5 µM	100 µM
Compuesto 4	0.5 µM	100 µM
ABZ	0.5 µM	50 µM
Atenolol	0.3 µM	70 µM
Propranolol	0.3 µM	70 µM

7.1.1.3 Precisión

Los resultados de repetibilidad y de reproducibilidad obtenidos se muestran en las Tablas 16 y 17.

En cada método se verificó que el CV % de las concentraciones recuperadas de los puntos control a cada nivel fuera menor a 15 %.

Tabla 16. Repetibilidad de los métodos utilizados para la cuantificación de los compuestos bajo estudio.

	Concentración nominal µM	Concentración recuperada µM					Promedio	DE	CV%
		1	2	3	4	5			
Compuesto 1	1.5	1.46	1.52	1.49	1.48	1.51	1.49	0.021	1.43
	30	30.08	30.50	29.89	30.68	29.44	30.12	0.494	1.64
	60	60.88	59.75	58.97	61.57	59.48	60.13	1.065	1.77
Compuesto 2	1.5	1.47	1.52	1.52	1.47	1.46	1.49	0.025	1.71
	30	29.19	29.95	30.34	30.31	30.45	30.05	0.515	1.71
	90	88.53	89.03	90.34	90.46	90.65	89.80	0.954	1.06
Compuesto 3	1.5	1.54	1.50	1.50	1.49	1.50	1.51	0.018	1.26
	30	30.38	30.42	30.48	30.66	30.79	30.55	0.174	0.57
	90	88.92	89.17	89.94	89.34	89.36	89.35	0.377	0.42
Compuesto 4	1.5	1.50	1.53	1.47	1.51	1.50	1.50	0.021	1.46
	30	29.48	30.77	30.38	30.25	29.15	30.01	0.670	2.23
	90	87.39	89.52	91.95	89.69	90.35	89.78	1.644	1.83
ABZ	1.5	1.47	1.48	1.48	1.51	1.51	1.49	0.017	1.15
	15	14.57	14.97	15.26	14.68	14.66	14.83	0.282	1.90
	30	30.26	30.65	30.29	29.63	30.37	30.24	0.371	1.23
Atenolol	1.5	1.49	1.46	1.50	1.48	1.52	1.49	0.022	1.53
	30	30.35	30.09	30.85	30.00	29.81	30.22	0.405	1.34
	60	59.05	58.72	59.96	59.74	58.79	59.25	0.565	0.95
Propranolol	1.5	1.46	1.52	1.47	1.48	1.47	1.48	0.023	1.62
	30	29.85	30.09	29.44	30.35	30.43	30.03	0.403	1.34
	60	58.42	60.36	59.52	58.70	60.27	59.45	0.885	1.49

Tabla 17. Reproducibilidad de los métodos utilizados para la cuantificación de los compuestos bajo estudio.

	Concentración nominal	Concentración recuperada μM										Promedio	DE	CV %
	μM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
Compuesto 1	1.5	1.46	1.52	1.49	1.48	1.51	1.53	1.51	1.52	1.49	1.50	1.50	0.02	1.36
	30	30.08	30.50	29.89	30.68	29.44	30.38	30.51	29.73	30.57	30.78	30.26	0.45	1.48
	60	60.88	59.75	58.97	61.57	59.48	59.96	61.53	61.75	60.42	59.78	60.41	0.98	1.62
Compuesto 2	1.5	1.47	1.52	1.52	1.47	1.46	1.50	1.47	1.46	1.53	1.52	1.49	0.03	1.86
	30	29.19	29.95	30.34	30.31	30.45	29.37	29.42	29.59	29.72	29.62	29.80	0.44	1.49
	90	88.53	89.03	90.34	90.46	90.65	88.63	87.33	87.95	89.17	89.66	89.17	1.11	1.24
Compuesto 3	1.5	1.54	1.50	1.50	1.49	1.50	1.48	1.50	1.49	1.50	1.51	1.50	0.02	1.07
	30	30.38	30.42	30.48	30.66	30.79	30.27	30.18	30.54	30.47	30.49	30.47	0.18	0.57
	90	88.92	89.17	89.94	89.34	89.36	90.74	91.62	91.77	90.49	92.25	90.36	1.20	1.33
Compuesto 4	1.5	1.50	1.53	1.47	1.51	1.50	1.47	1.52	1.49	1.47	1.50	1.50	0.02	1.51
	30	29.48	30.77	30.38	30.25	29.15	29.62	29.35	29.29	29.38	29.97	29.76	0.55	1.84
	90	87.39	89.52	91.95	89.69	90.35	91.32	91.00	90.88	90.36	91.32	90.38	1.29	1.43
ABZ	1.5	1.47	1.48	1.48	1.51	1.51	1.47	1.48	1.48	1.52	1.52	1.49	0.02	1.42
	15	14.57	14.97	15.26	14.68	14.66	14.79	14.67	14.97	14.69	14.68	14.79	0.21	1.41
	30	30.26	30.65	30.29	29.63	30.37	30.74	30.62	30.78	30.10	30.85	30.43	0.38	1.23
Atenolol	1.5	1.49	1.46	1.50	1.48	1.52	1.54	1.48	1.50	1.47	1.47	1.49	0.03	1.70
	30	30.35	30.09	30.85	30.00	29.81	29.66	29.54	29.17	29.94	29.96	29.94	0.46	1.53
	60	59.05	58.72	59.96	59.74	58.79	59.94	59.30	61.52	59.75	59.33	59.61	0.81	1.36
Propranolol	1.5	1.46	1.52	1.47	1.48	1.47	1.52	1.50	1.46	1.47	1.50	1.48	0.02	1.52
	30	29.85	30.09	29.44	30.35	30.43	30.08	30.62	29.59	30.70	30.46	30.16	0.43	1.42
	60	58.42	60.36	59.52	58.70	60.27	61.45	61.21	61.61	60.38	59.22	60.11	1.12	1.87

7.1.1.4 Exactitud

Cada uno de los métodos evaluados mostró una variación menor al 15 % respecto al valor nominal a los tres diferentes niveles de concentración se puede observar en la Tabla 18.

Tabla 18. Exactitud del método de cuantificación para cada compuesto.

	Concentración nominal	Concentración recuperada μM										Promedio
	μM	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Compuesto 1	1.5	103.73	95.22	99.62	96.99	94.16	101.87	100.92	101.56	99.07	99.80	99.29
	30	103.53	103.28	95.46	102.26	98.12	104.35	107.33	99.10	101.90	102.59	101.79
	60	107.11	111.47	109.21	108.95	110.91	103.28	104.08	105.40	104.03	106.08	107.05
Compuesto 2	1.5	98.29	101.12	101.04	98.25	97.54	99.79	97.95	97.24	102.10	101.61	99.49
	30	97.29	99.85	101.12	101.04	101.49	97.90	98.08	98.62	99.08	98.72	99.32
	90	98.37	98.92	100.37	100.51	100.72	98.48	97.03	97.72	99.07	99.62	99.08
Compuesto 3	1.5	102.76	100.09	100.21	99.50	100.30	98.65	100.07	99.55	100.03	100.82	100.20
	30	101.25	101.40	101.59	102.21	102.63	100.92	100.61	101.82	101.58	101.63	101.56
	90	98.80	99.08	99.94	99.26	99.29	100.82	101.80	101.97	100.54	102.50	100.40
Compuesto 4	1.5	100.25	102.20	98.18	100.70	99.78	97.95	101.57	99.59	97.77	100.33	99.83
	30	98.25	102.58	101.27	100.82	97.18	98.72	97.84	97.64	97.95	99.90	99.21
	90	97.10	99.47	102.17	99.66	100.39	101.47	101.11	100.98	100.40	101.47	100.42
ABZ	1.5	98.16	98.36	98.63	100.50	100.39	97.89	98.43	98.36	101.65	101.19	99.35
	15	97.13	99.78	101.70	97.83	97.76	98.57	97.78	99.77	97.93	97.85	98.61
	30	100.87	102.16	100.98	98.78	101.23	102.47	102.07	102.58	100.34	102.83	101.43
Atenolol	1.5	99.13	97.23	100.29	98.88	101.25	102.71	98.96	99.92	97.81	97.86	99.40
	30	101.17	100.30	102.85	99.99	99.36	98.86	98.47	97.24	99.79	99.87	99.79
	60	98.42	97.86	99.93	99.57	97.99	99.91	98.83	102.54	99.59	98.88	99.35
Propranolol	1.5	97.23	101.27	97.89	98.86	97.84	101.07	99.77	97.46	97.69	99.81	98.89
	30	99.48	100.31	98.13	101.18	101.43	100.26	102.06	98.64	102.34	101.52	100.54
	60	97.37	100.60	99.20	97.83	100.45	102.42	102.01	102.68	100.64	98.71	100.19

7.1.1.5 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se estableció como la concentración inferior del intervalo de trabajo. En la Tabla 19 se puede observar que en todos los casos el coeficiente de variación fue menor al 20 % y la exactitud se mantuvo en el intervalo del ± 15 % de su valor nominal.

Tabla 19. Límite de cuantificación para los métodos evaluados.

Compuesto	Límite Inferior μM	Promedio μM	DE	CV %
Compuesto 1	0.5	0.48	0.011	2.39
Compuesto 2	0.5	0.50	0.027	5.51
Compuesto 3	0.5	0.48	0.031	6.58
Compuesto 4	0.5	0.47	0.015	3.38
ABZ	0.5	0.52	0.043	8.27
Atenolol	0.3	0.28	0.022	7.92
Propranolol	0.3	0.29	0.014	4.99

7.1.1.6 Límite de detección

El límite de detección determinado para los compuestos **1-4** y ABZ fue 0.1 μM . Para el caso del atenolol y propranolol fue de 0.05 μM .

7.2 SOLUBILIDAD

Las pruebas de solubilidad para los nuevos compuestos y el ABZ se realizaron a 25 °C, y los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 20.

Tabla 20. Solubilidad de los nuevos compuestos a 25 °C

Disolvente	Compuesto (mg/mL)				
	1	2	3	4	ABZ
CCl ₄	0.3	0.33	1.6	2.8	0.071
ACN	8.22	16	1.02	6	0.16
DMSO	25	24	18.66	58	6.25
Octanol	15.5	2.18	2.95	15	0.13
Etanol	44	36	11.5	44	0.36
Metanol	12.4	27	22	42	0.57
Agua	0.019	0.014	0.018	0.015	ND
Fosfatos pH 7.4	0.028	0.013	0.013	0.016	ND
FIS	0.024	0.015	0.016	0.016	ND
HCl 0.1 M	9.2	2.43	8	1.06	0.04
FGS	9	1	3.8	2.8	0.058
LSS 1 %	0.41	0.241	0.43	1.13	0.09

De las pruebas de solubilidad al equilibrio en agua a 25 °C mediante el procedimiento reportado por Yalkowski (Tabla 21), se encontró que los compuestos **1-4** son significativamente más solubles que el ABZ ($p < 0.05$). Se observa que el compuesto **3** es el más soluble en agua (0.148 mg/mL) mientras que el ABZ muestra el menor valor de solubilidad (0.0024 mg/mL).

Tabla 21. Solubilidad de los compuestos **1-4** y **ABZ** en agua a 25 °C (Yalkowski y cols. 1983).

	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	Compuesto 4	*ABZ
Repetición	Concentración (mg/mL)				
1	0.1341	0.0483	0.1479	0.0784	0.0022
2	0.1280	0.0481	0.1504	0.0784	0.0025
3	0.1211	0.0502	0.1463	0.0692	0.0025
Promedio	0.1277	0.0489	0.1482	0.0753	0.0024
DE	0.0065	0.0012	0.0021	0.0053	0.0002
CV %	5.10	2.40	1.41	7.08	8.00

*p < 0.05

7.3 DETERMINACIÓN DEL pK_a

En la Figura 17 se muestran los espectros de absorción de los compuestos evaluados a diferentes valores de pH, mientras que en la Tabla 22 se encuentran reportados los valores de pK_a obtenidos mediante el ajuste realizado con el software Origin y el software pHab. Con ambas metodologías se encontraron para cada compuesto tiene 2 valores de pK_a .

Tabla 22. Valores de pK_a determinados con el software pHab y Origin.

SOFTWARE	Compuesto 1		Compuesto 2		Compuesto 3		Compuesto 4	
	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a2}
ORIGIN	3.9799	10.6236	3.3513	9.9646	3.9370	10.8150	3.3778	10.1761
PK-AB	4.0114	10.5403	3.3372	9.9525	3.9680	10.6061	3.3813	10.0366

7.4 DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARTICIÓN (Log P).

En la Tabla 23 se muestran los valores de Log P y Clog P determinados para los compuestos bajo estudio.

Tabla 23. Valores de Log P y Clog P de cada uno de los compuestos evaluados.

Compuesto	Log P	CLog P
1	1.97 ± 0.02	1.7 ± 0.75
2	2.37 ± 0.17	2.02 ± 0.77
3	1.85 ± 0.10	2.19 ± 0.75
4	1.97 ± 0.14	2.51 ± 0.77
ABZ	3.46 ± 0.12	1.2 ± 0.64

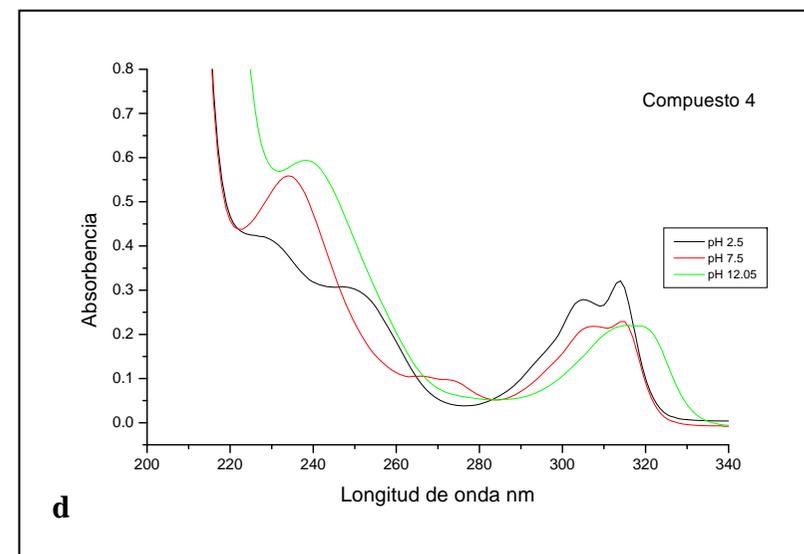
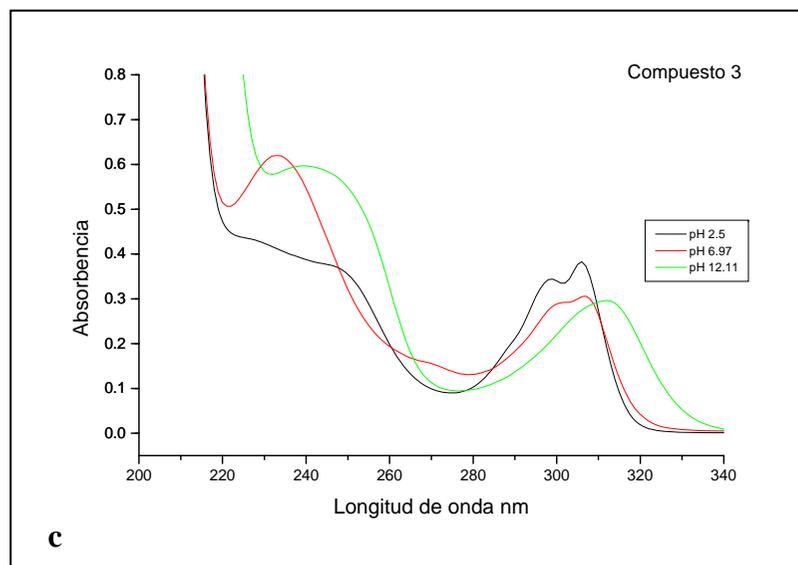
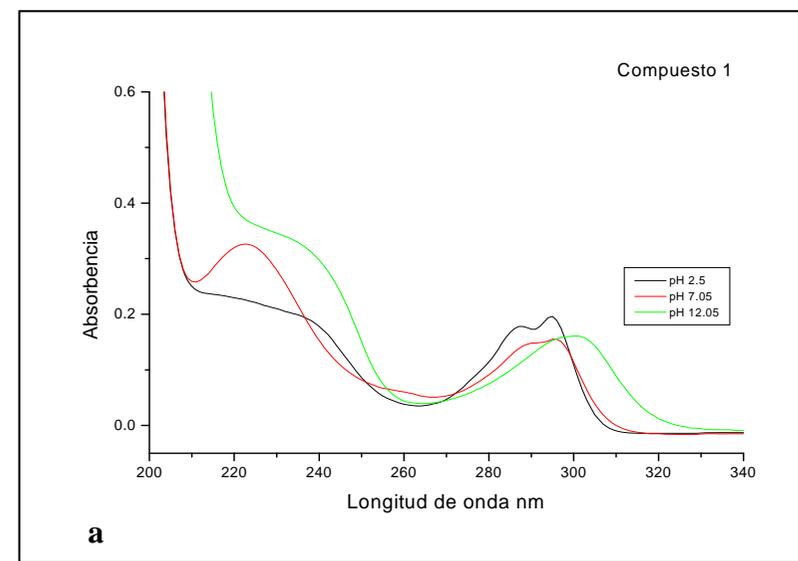
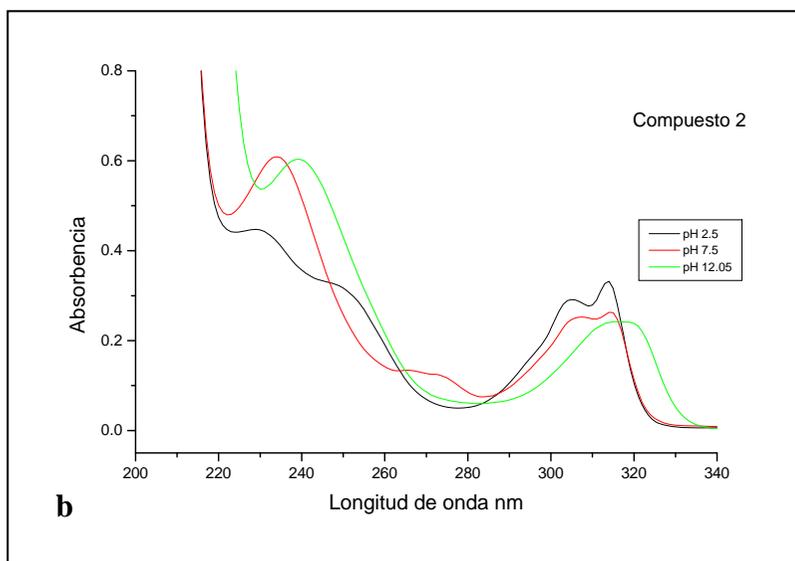


Figura 17. Espectros de absorción en el intervalo ultravioleta y a diferentes valores de pH. a) Compuesto 1, b) Compuesto 2, c) Compuesto 3, d) Compuesto 4.

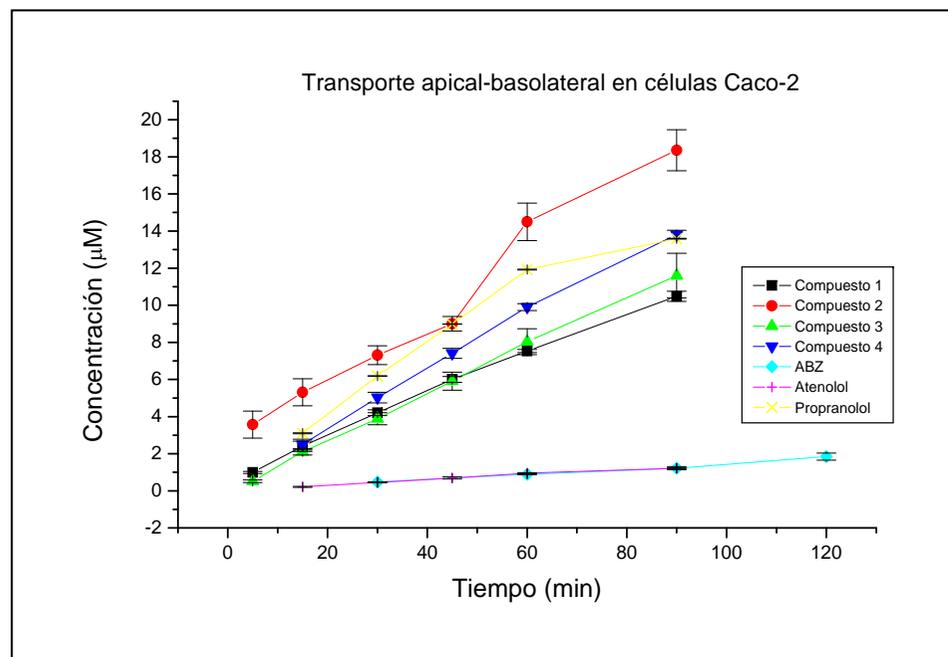
7.5 DETERMINACIÓN DEL COEFICIENTE DE PERMEABILIDAD (Papp) EN LAS LÍNEAS CELULARES CACO-2 Y MDCK.

Los resultados de permeabilidad de los nuevos compuestos en las líneas celulares Caco-2 y MDCK se muestran en la Figura 18 y Figura 19 respectivamente. Con la finalidad de identificar la posible presencia de mecanismos de transporte activo para los compuestos en las líneas celulares utilizadas, adicionalmente se determinó el valor de la relación de transporte basolateral-apical/apical-basolateral (B-A/B-A). Los valores obtenidos se presentan en la Tabla 24.

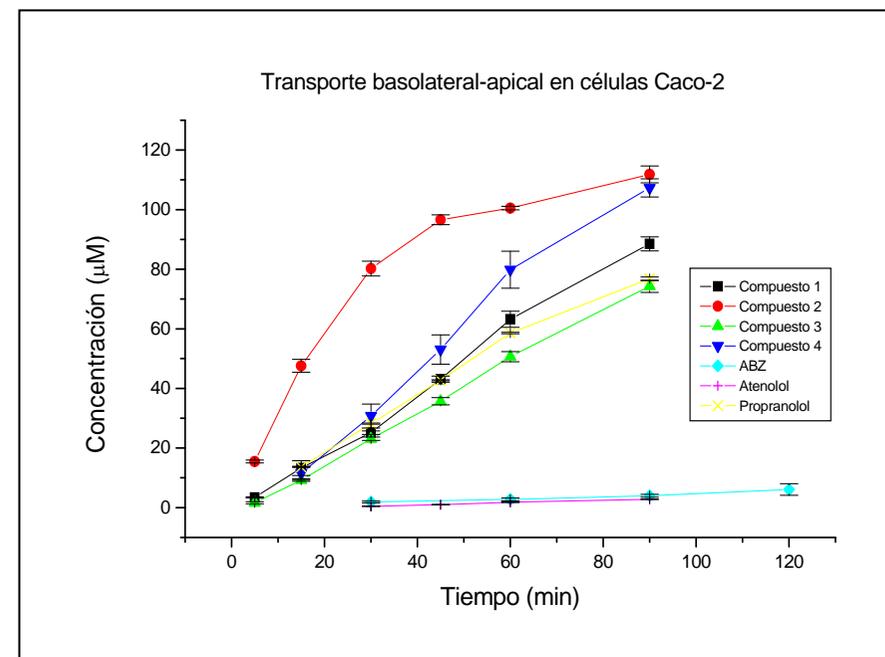
Tabla 24. Permeabilidad y relación B-A/A-B para el transporte de los compuestos evaluados en las líneas celulares Caco-2 y MDCK.

Compuesto	Células Caco-2			Células MDCK		
	Papp (cm/s x 10 ⁻⁵)					
	A-B	B-A	B-A/A-B	A-B	B-A	B-A/A-B
1	2.46	7.25	2.947	1.619	6.554	4.049
2	3.967	8.528	2.15	3.121	2.788	0.905
3	2.862	6.396	2.23	2.314	6.422	2.77
4	3.347	9.68	2.89	3.396	10.24	3.014
ABZ	0.655	0.338	0.517	0.757	0.51	0.674
Atenolol	0.3222	0.3164	0.982	0.429	0.8482	1.977
Propranolol	3.144	8.633	2.74	3.652	8.568	2.346

Permeabilidad de los compuestos 1-4 en células Caco-2



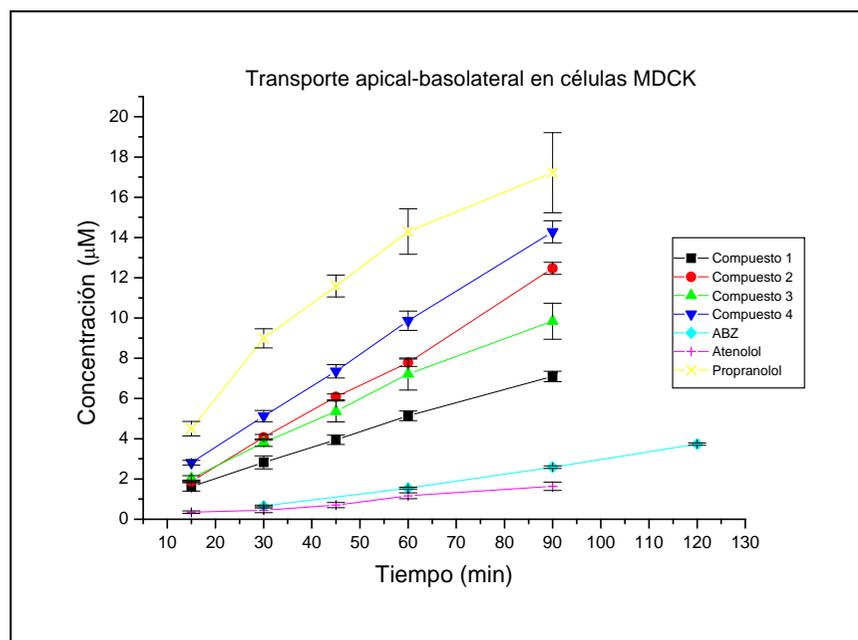
(a)



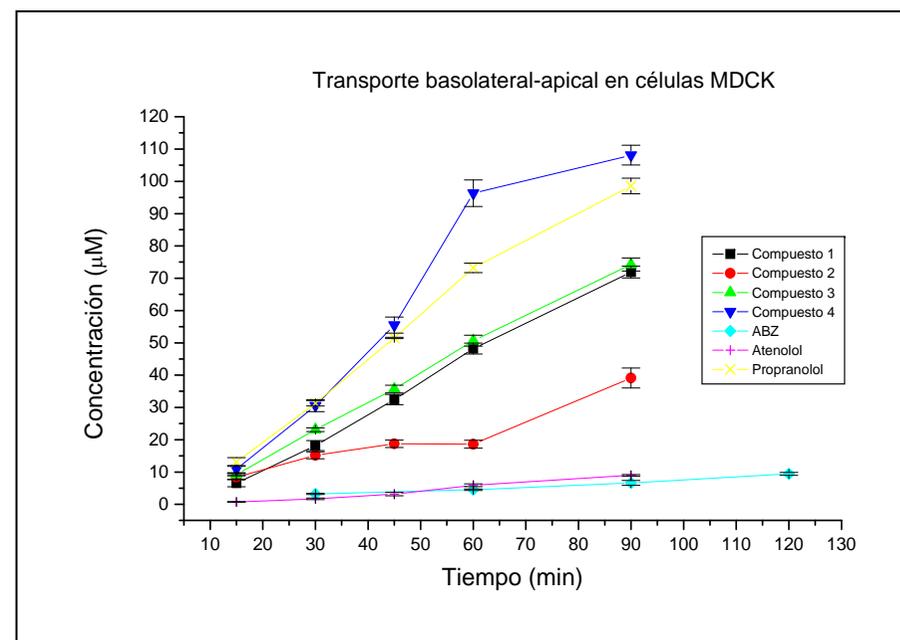
(b)

Figura 18. Transporte apical-basolateral (a) y basolateral-apical (b) en células Caco-2.

Permeabilidad de los compuestos 1-4 en células MDCK



(a)



(b)

Figura 19. Transporte apical-basolateral (a) y basolateral-apical (b) en células MDCK.

7.6. ESTUDIOS *IN VIVO*

Se realizó un estudio de farmacocinética, eligiéndose el compuesto **1** como molécula representativa de la serie. Previo al estudio, se desarrolló y validó el método analítico para la cuantificación tanto del compuesto **1** como de sus probables metabolitos compuesto **5** (sulfóxido) y compuesto **6** (sulfona) en plasma.

7.6.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA CUANTIFICACIÓN DEL COMPUESTO 1 Y SUS METABOLITOS SULFÓXIDO Y SULFONA EN PLASMA HUMANO Y DE RATÓN

7.6.1.1 Selectividad

En la Figura 20 se presentan los cromatogramas típicos del blanco de ácido clorhídrico 0.01 N, el compuesto **1** y sus metabolitos en el mismo disolvente y en plasma humano. Se puede apreciar claramente que los picos presentan una resolución adecuada entre ellos, así como ausencia de otras interferencias.

Los tiempos de retención fueron 5.17, 6.38, 9.80, 12.12 minutos para el compuesto **5**, compuesto **6**, compuesto **1** y para el estándar externo (compuesto **3**), respectivamente.

7.6.1.2 Linealidad de Sistema y Método

En la Figura 21 se puede observar las gráficas representativas de la linealidad del sistema y método para la cuantificación del compuesto **1** y sus metabolitos en plasma humano y en plasma de ratón. En cada caso, se verificó que el coeficiente de correlación fuera mayor a 0.99. Los intervalos de cuantificación para cada compuesto fueron los siguientes: 18.75 – 600 ng/mL para los compuestos **1** y **6**, y 29.06 – 1250 ng/mL para el compuesto **5**.

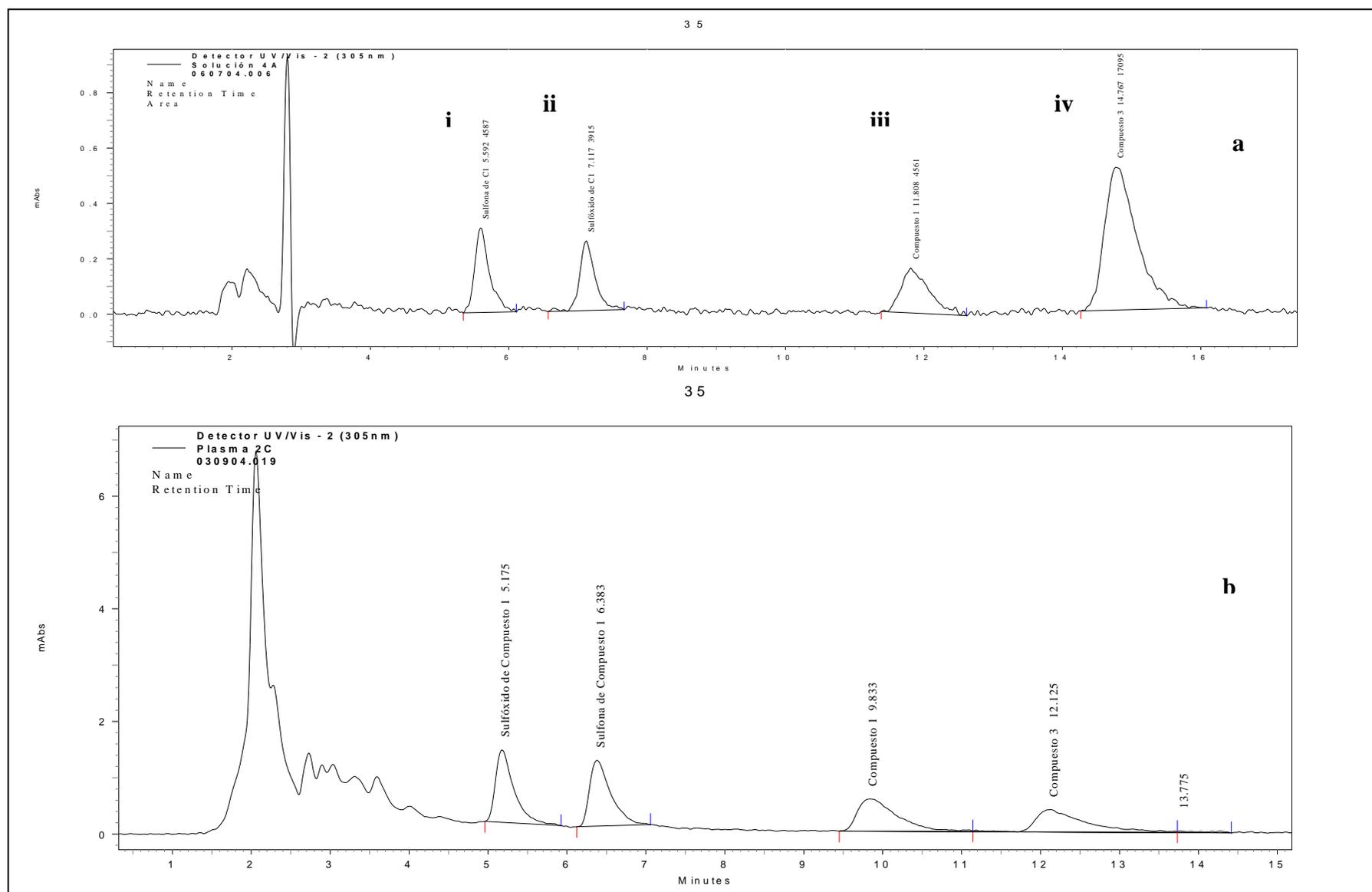


Figura 20. Cromatogramas típicos del compuesto **1** y sus metabolitos compuesto **5** y **6** en HCl 0.01 N (a), en plasma humano (b), plasma de ratón (c) y blanco de plasma humano (d). Orden de elución: i) Compuesto **6**, ii) Compuesto **5**, iii) Compuesto **1**, iv) Estándar Externo.

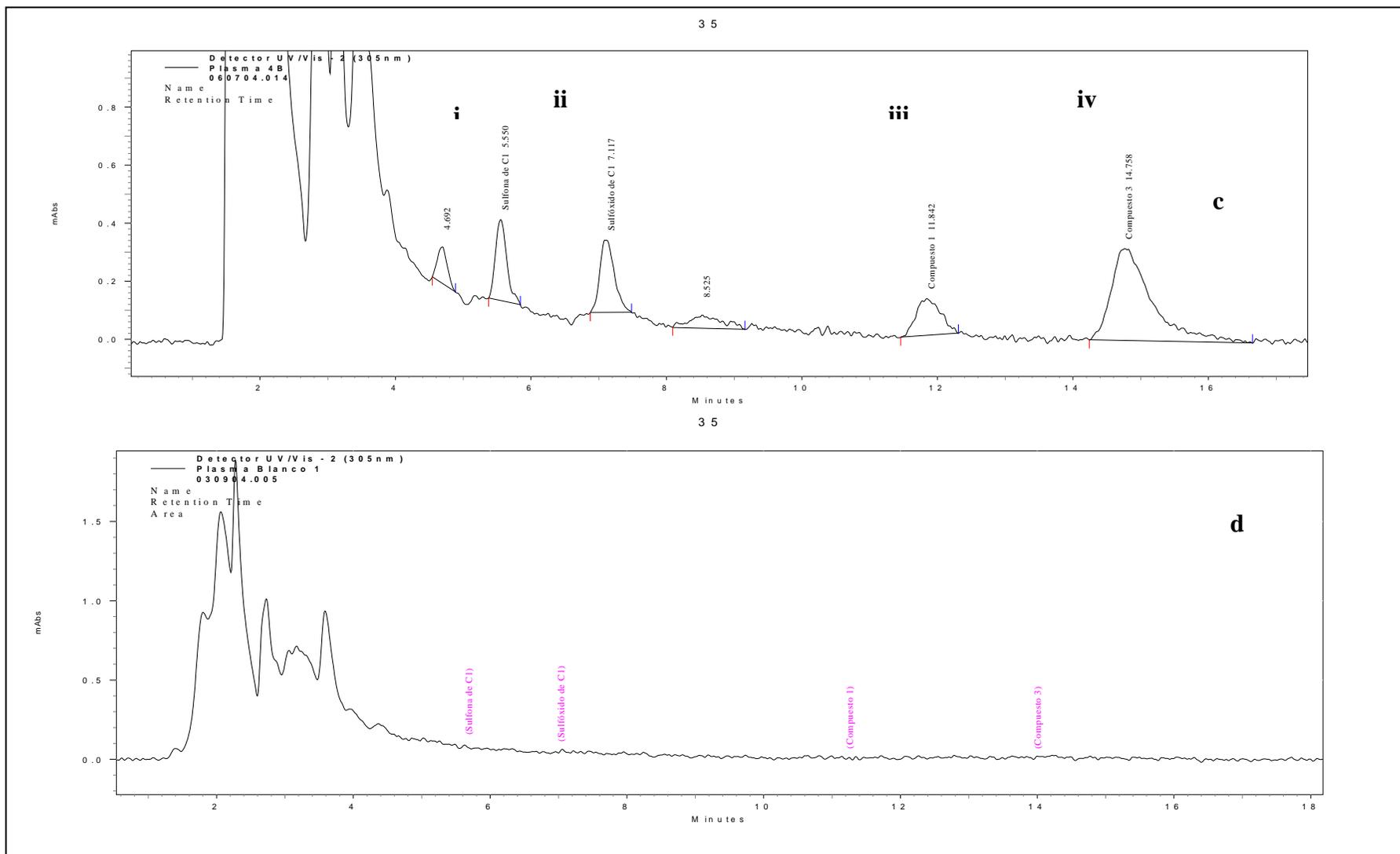


Figura 20. Continuación...

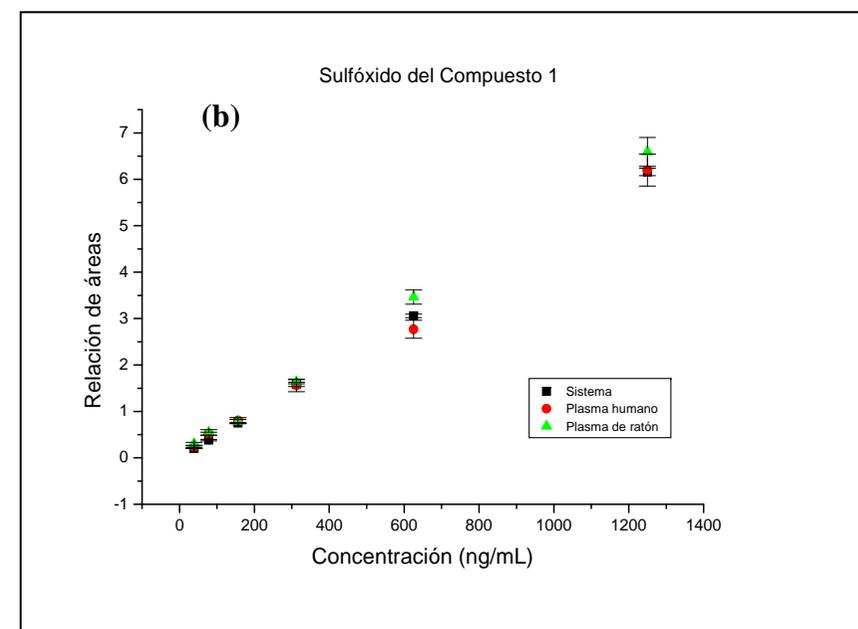
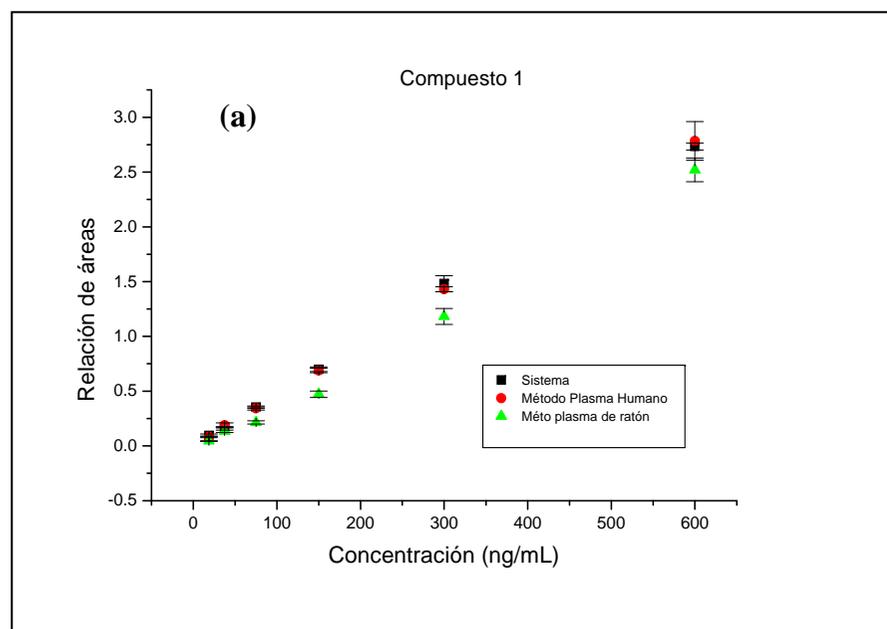
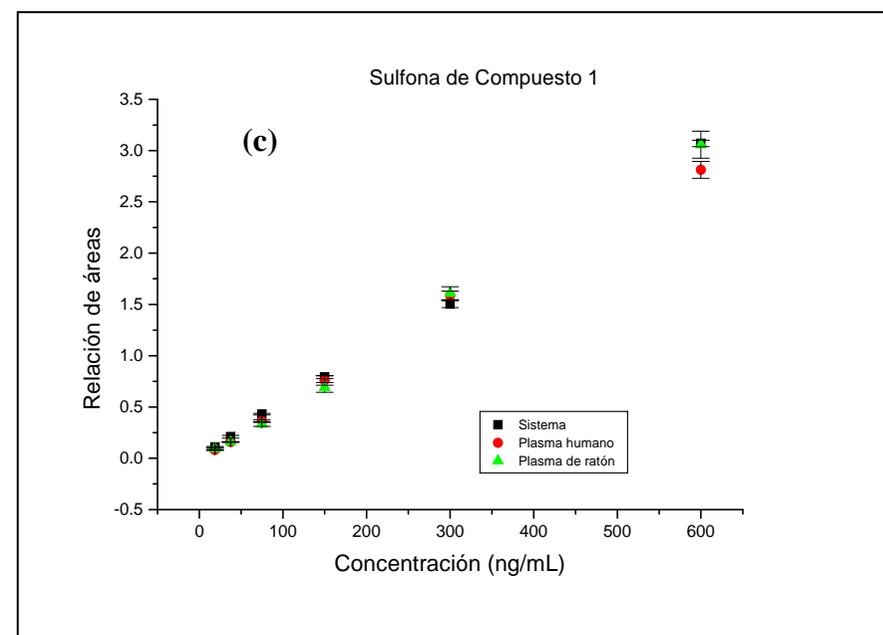


Figura 21. Linealidad del método analítico para la cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos compuesto 5 y 6. a) Compuesto 1; b) Compuesto 5; c) Compuesto 6



7.6.1.3 % Recobro en plasma humano

En la Tabla 25 se puede observar que el % de recobro del compuesto **1** y sus metabolitos compuesto **5** y **6** en plasma humano fue de 97.68, 97.59 y 96.58 % respectivamente.

Tabla 25. % de Recobro del compuesto **1** y sus principales metabolitos compuesto **5** y **6**.

Compuesto 1				
Concentración	Relación de áreas (Sistema)			
ng/mL	1	2	3	Promedio
50	0.25685	0.25430	0.23740	0.2495
100	0.47603	0.46498	0.44875	0.4633
400	1.58292	1.49008	1.54158	1.5382
Relación de áreas (Método)				
50	0.23643	0.22868	0.22303	0.2294
100	0.47171	0.44802	0.45027	0.4567
400	1.49141	1.59968	1.63148	1.5742
% Recobro absoluto				
50	92.05	89.93	93.95	91.98
100	99.09	96.35	100.34	98.59
400	94.22	107.36	105.83	102.47
Promedio Total				97.68
Compuesto 5				
Concentración	Relación de áreas (Sistema)			
ng/mL	1	2	3	Promedio
50	0.43688	0.45650	0.42414	0.4392
600	2.59047	2.60118	2.84946	2.6804
1000	4.13119	4.51239	4.17021	4.2713
Relación de áreas (Método)				
50	0.42959	0.40803	0.43078	0.4228
600	2.42792	2.77040	2.70774	2.6354
1000	4.07044	3.99432	4.45282	4.1725
% Recobro absoluto				
50	98.33	89.38	101.56	96.42
600	93.73	106.51	95.03	98.42
1000	98.53	88.52	106.78	97.94
Promedio Total				97.57
Compuesto 6				
Concentración	Relación de áreas (Sistema)			
ng/mL	1	2	3	Promedio
50	0.25457	0.21545	0.23764	0.2359
100	0.53041	0.48716	0.53412	0.5172
400	2.13779	2.29164	2.28889	2.2394
Relación de áreas (Método)				
50	0.24304	0.20985	0.25390	0.2356
100	0.51617	0.47944	0.48827	0.4946
400	1.99516	2.11788	2.21100	2.1080
% Recobro absoluto				
50	95.47	97.40	106.84	99.90
100	97.32	98.41	91.42	95.72
400	93.33	92.42	96.60	94.12
Promedio Total				96.58

7.6.1.4 Precisión en plasma humano

En la Tabla 26 se presentan los datos de repetibilidad y en la Tabla 27 los valores de reproducibilidad del método para la cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos.

Tabla 26. Repetibilidad del método de cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos compuesto 5 y 6 en plasma humano.

	Concentración nominal	Concentración recuperada ng/mL			Promedio	DE	CV%
	ng/mL	1	2	3			
Compuesto 1	50	49.33	49.92	49.27	49.51	0.35	0.72
	100	99.40	97.54	98.96	98.63	0.96	0.98
	400	396.01	395.15	388.23	393.13	4.26	1.09
Compuesto 5	50	48.68	47.06	49.34	48.36	1.17	2.43
	600	577.68	599.16	559.41	578.75	19.89	3.44
	1000	982.90	1018.27	974.90	992.03	23.07	2.33
Compuesto 6	50	51.84	47.54	49.15	49.51	2.17	4.39
	100	86.75	94.36	95.21	92.11	4.65	5.06
	400	405.45	391.99	384.58	394.01	10.58	2.69

Tabla 27. Reproducibilidad del método de cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos compuesto 5 y 6 en plasma humano.

	Concentración nominal	Concentración recuperada ng/mL						Promedio	DE	CV %
	ng/mL	1	2	3	4	5	6			
Compuesto 1	50	49.33	49.92	49.27	49.25	46.43	48.95	48.86	1.23	2.52
	100	99.40	97.54	98.96	97.25	97.72	96.45	97.89	1.10	1.12
	400	396.01	395.15	388.23	385.52	393.14	401.17	393.20	5.63	1.43
Compuesto 5	50	48.68	47.06	49.34	46.38	40.88	46.68	46.50	2.99	6.43
	600	577.68	599.16	559.41	555.82	643.13	627.16	593.73	35.94	6.05
	1000	982.90	1018.27	974.90	974.56	955.15	1072.04	996.31	42.47	4.26
Compuesto 6	50	51.84	47.54	49.15	49.48	43.13	51.55	48.78	3.2	6.55
	100	86.75	94.36	95.21	101.7	94.67	96.36	94.84	4.8	5.06
	400	405.45	391.99	384.58	384.46	407.92	425.72	400.02	16.11	4.03

7.6.1.5 Exactitud en plasma humano

El método de cuantificación en plasma humano demostró ser exacto. Los resultados se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Exactitud del método de cuantificación simultánea del compuesto **1** y sus metabolitos compuesto **5** y **6** en plasma humano (% de recuperación relativa).

	Concentración nominal	Recuperación Relativa (%)						Promedio
	ng/mL	1	2	3	4	5	6	
Compuesto 1	50	98.67	99.83	98.54	98.49	92.85	97.90	97.71
	100	99.40	97.54	98.96	97.25	97.72	96.45	97.89
	400	99.00	98.79	97.06	96.38	98.29	100.29	98.30
Compuesto 5	50	97.35	94.11	98.68	92.76	81.76	93.37	93.00
	600	96.28	99.86	93.23	92.64	107.19	104.53	98.95
	1000	98.29	101.83	97.49	97.46	95.52	107.20	99.63
Compuesto 6	50	103.67	95.07	98.3	98.95	86.26	103.1	97.56
	100	86.75	94.36	95.21	101.7	94.67	96.36	94.84
	400	101.36	98	96.15	96.11	101.98	106.43	100.01

7.6.1.6 Límite de cuantificación en plasma humano

En la Tabla 29 se muestra la evaluación del límite de cuantificación para el compuesto **1** y sus metabolitos en plasma humano.

Tabla 29. Límite de cuantificación del método de cuantificación simultánea para el compuesto **1** y sus metabolitos compuesto **5** y **6** en plasma humano.

Compuesto	Límite Inferior ng/mL	Promedio ng/mL	DE	CV %
Compuesto 1	18.75	17.03	1.429	8.40
Compuesto 5	39.06	34.44	1.357	3.94
Compuesto 6	18.75	16.92	1.052	6.22

7.6.1.7 Límite de detección en plasma humano

El límite de detección de los compuestos fue: 9.4 ng/mL para los compuestos **1** y **6** y 18.75 ng/mL para el compuesto **5**.

7.6.1.8 Estabilidad en plasma humano

Los resultados de estabilidad bajo las diferentes condiciones de trabajo se registran en las tablas 30 a, b, c y d.

Tabla 30 (a) Estabilidad del compuesto 1 y sus metabolitos a temperatura ambiente

Compuesto 1									
	0 h			12 h			24 h		
Conc. nominal (ng/mL)	50	100	400	50	100	400	50	100	400
Conc. Recuperada (ng/mL)	51.18	101.83	392.65	49.52	92.83	382.07	47.62	97.44	388.82
	55.54	95.49	384.89	56.74	98.71	379.84	46.47	94.38	375.27
	51.21	98.42	364.53	54.36	98.78	392.69	55.48	95.74	389.13
Promedio	51.98	98.94	385.52	52.65	97.58	388.65	49.89	96.89	388.31
Desv. absoluta (%)				1.29	1.37	0.81	4.02	2.07	0.72
Compuesto 5									
	0 h			12 h			24 h		
Conc. nominal (ng/mL)	50	600	1000	50	600	1000	50	600	1000
Conc. Recuperada (ng/mL)	49.00	602.66	969.42	46.36	636.88	1002.20	49.29	630.59	1032.75
	55.99	566.05	971.19	46.96	580.01	912.58	44.38	610.39	924.53
	47.32	560.87	959.37	47.13	618.44	993.46	43.56	526.11	960.80
Promedio	50.58	582.40	974.99	47.61	608.83	977.06	46.81	591.77	979.52
Desv. absoluta (%)				5.87	4.54	0.21	7.45	1.61	0.46
Compuesto 6									
	0 h			12 h			24 h		
Conc. nominal (ng/mL)	50	100	400	50	100	400	50	100	400
Conc. Recuperada (ng/mL)	44.87	98.27	361.62	43.41	95.77	394.18	46.60	97.17	394.55
	48.34	93.12	376.50	47.69	102.03	382.95	46.50	95.83	389.07
	46.88	96.46	383.12	49.61	92.18	375.23	48.17	100.96	379.01
Promedio	47.52	96.96	380.31	47.68	97.49	388.09	47.82	98.49	390.66
Desv. absoluta (%)				0.34	0.55	2.05	0.63	1.58	2.72

Tabla 30 (b) Estabilidad del compuesto 1 y sus metabolitos en ciclos congelación/descongelación.

Compuesto 1						
	0 ciclos			2 ciclos		
Conc. nominal (ng/mL)	50	100	400	50	100	400
Conc. recuperada (ng/mL)	51.18	101.83	392.65	57.43	104.46	410.80
	55.54	95.49	384.89	50.56	92.44	424.81
	51.21	98.42	364.53	48.46	98.18	368.29
Promedio	51.98	98.94	385.52	51.61	98.77	400.98
Desv. absoluta (%)				0.71	0.17	4.01
Compuesto 5						
	0 ciclos			2 ciclos		
Conc. nominal (ng/mL)	50	600	1000	50	600	1000
Conc. recuperada (ng/mL)	49.00	602.66	969.42	51.96	601.61	989.89
	55.99	566.05	971.19	49.10	632.66	946.87
	47.32	560.87	959.37	45.06	616.77	958.76
Promedio	50.58	582.40	974.99	49.03	612.76	973.88
Desv. absoluta (%)				3.06	5.21	0.11
Compuesto 6						
	0 ciclos			2 ciclos		
Conc. nominal (ng/mL)	50	100	400	50	100	400
Conc. recuperada (ng/mL)	44.87	98.27	361.62	50.33	103.80	379.85
	48.34	93.12	376.50	44.06	92.31	397.26
	46.88	96.46	383.12	45.55	100.41	395.98
Promedio	47.52	96.96	380.31	47.49	99.13	393.27
Desv. absoluta (%)				1.06	2.24	3.41

Tabla 30 (c) Estabilidad del compuesto **1** y sus metabolitos en refrigeración (4 °C)

Compuesto 1									
	0 h			24 h			48 h		
Conc. nominal (ng/mL)	50	100	400	50	100	400	50	100	400
Conc. recuperada (ng/mL)	51.18	101.83	392.65	52.69	96.71	372.25	50.89	100.15	386.38
	55.54	95.49	384.89	43.27	101.41	364.28	44.15	98.63	396.98
	51.21	98.42	364.53	53.09	92.99	397.01	53.79	96.10	379.02
Promedio	51.98	98.94	385.52	49.76	97.78	383.39	49.71	98.72	390.59
Desv. absoluta (%)				4.27	1.17	0.55	4.37	0.22	1.32
Compuesto 5									
	0 h			24 h			48 h		
Conc. nominal (ng/mL)	50	600	1000	50	600	1000	50	600	1000
Conc. recuperada (ng/mL)	49.00	602.66	969.42	50.11	576.12	970.80	51.25	576.51	1022.18
	55.99	566.05	971.19	53.41	560.76	945.23	50.16	628.30	982.73
	47.32	560.87	959.37	46.70	607.94	922.35	48.42	536.90	1053.11
Promedio	50.58	582.40	974.99	50.06	586.20	959.60	49.96	585.43	1014.50
Desv. absoluta (%)				1.03	0.65	1.58	1.23	0.52	4.05
Compuesto 6									
	0 h			24 h			48 h		
Conc. nominal (ng/mL)	50	100	400	50	100	400	50	100	400
Conc. recuperada (ng/mL)	44.87	98.27	361.62	45.53	102.58	387.79	50.37	98.56	423.36
	48.34	93.12	376.50	47.07	99.61	379.42	48.88	95.82	391.81
	46.88	96.46	383.12	44.90	97.22	391.76	47.66	98.17	414.29
Promedio	47.52	96.96	380.31	46.87	99.85	389.74	49.23	98.14	407.36
Desv. absoluta (%)				1.37	2.98	2.48	3.60	1.22	7.11

Tabla 30 (d) Estabilidad del compuesto **1** y sus metabolitos en congelación (-20 °C)

Compuesto 1									
	0 días			7 días			30 días		
Conc. nominal (ng/mL)	50	100	400	50	100	400	50	100	400
Conc. recuperada (ng/mL)	51.18	101.83	392.65	50.67	105.01	394.57	47.33	98.36	390.67
	55.54	95.49	384.89	48.20	99.55	383.13	54.93	92.53	442.75
	51.21	98.42	364.53	49.26	100.88	389.13	51.21	95.55	401.77
Promedio	51.98	98.94	385.52	49.53	101.36	391.71	50.87	96.61	408.80
Desv. absoluta (%)				4.71	2.45	1.61	2.14	2.35	6.04
Compuesto 5									
	0 días			7 días			30 días		
Conc. nominal (ng/mL)	50	600	1000	50	600	1000	50	600	1000
Conc. recuperada (ng/mL)	49.00	602.66	969.42	48.04	645.02	928.85	48.58	572.27	984.62
	55.99	566.05	971.19	46.81	574.20	893.85	49.05	578.30	970.60
	47.32	560.87	959.37	53.45	582.33	963.91	48.97	570.58	981.66
Promedio	50.58	582.40	974.99	49.57	600.39	946.65	49.15	580.29	984.22
Desv. absoluta (%)				2.00	3.09	2.91	2.83	0.36	0.95
Compuesto 6									
	0 días			7 días			30 días		
Conc. nominal (ng/mL)	50	100	400	50	100	400	50	100	400
Conc. recuperada (ng/mL)	44.87	98.27	361.62	44.21	101.79	403.90	45.15	96.56	378.10
	48.34	93.12	376.50	46.77	96.95	381.48	46.30	94.24	402.47
	46.88	96.46	383.12	46.30	95.29	384.89	52.04	100.53	414.73
Promedio	47.52	96.96	380.31	46.82	98.51	392.57	48.37	97.83	398.83
Desv. absoluta (%)				1.47	1.60	3.22	1.79	0.90	4.87

7.6.1.9 Validación del método de cuantificación en plasma de ratón

El método de cuantificación para el compuesto **1** y sus metabolitos utilizando plasma de ratón cumplió con los criterios indicados en la NOM-177-SSA1-1998 para linealidad, precisión y exactitud.

Tabla 31. Repetibilidad del método de cuantificación simultánea del compuesto **1** y sus metabolitos compuesto **5** y **6** en plasma de ratón.

	Concentración nominal	Concentración recuperada ng/mL			Promedio	DE	CV%
	ng/mL	1	2	3			
Compuesto 1	50	49.99	50.91	47.76	49.56	1.619	3.27
	100	99.53	96.13	100.51	98.72	2.298	2.33
	400	398.03	368.62	400.30	388.98	17.67	4.54
Compuesto 5	50	48.33	52.74	49.92	50.33	2.230	4.43
	600	577.33	553.88	568.69	566.63	11.855	2.09
	1000	967.91	938.47	1010.70	972.36	36.323	3.74
Compuesto 6	50	48.83	50.19	49.28	49.43	0.691	1.40
	100	102.49	92.87	95.02	96.79	5.050	5.22
	400	402.94	376.76	394.77	391.49	13.39	3.42

Tabla 32. Reproducibilidad del método de cuantificación simultánea del compuesto **1** y sus metabolitos compuesto **5** y **6** en plasma de ratón.

	Concentración nominal	Concentración recuperada ng/mL						Promedio	DE	CV %
	ng/mL	1	2	3	4	5	6			
Compuesto 1	50	50.39	53.30	51.24	49.99	50.91	47.76	50.60	1.801	3.56
	100	99.31	97.16	99.00	99.53	96.13	100.51	98.61	1.634	1.66
	400	385.73	379.34	422.96	398.03	368.62	400.30	392.50	19.019	4.85
Compuesto 5	50	48.33	52.74	49.92	48.33	49.92	49.78	49.84	1.609	3.23
	600	577.33	553.88	568.69	595.02	587.32	587.85	578.35	15.108	2.61
	1000	967.91	938.47	1010.70	965.85	1013.26	967.42	977.27	29.098	2.98
Compuesto 6	50	48.83	50.19	49.28	48.83	48.52	48.84	49.08	0.593	1.21
	100	102.49	92.87	95.02	98.93	100.44	99.04	98.13	3.553	3.62
	400	402.94	376.76	394.77	394.49	391.75	386.64	391.22	8.844	2.26

Tabla 33. Exactitud del método de cuantificación simultánea del compuesto **1** y sus metabolitos compuesto **5** y **6** en plasma de ratón (% de recuperación relativa)

	Concentración nominal	Recuperación relativa (%)						Promedio
	ng/mL	1	2	3	4	5	6	
Compuesto 1	50	99.99	101.82	95.53	100.78	106.59	102.49	101.20
	100	99.53	96.13	100.51	99.31	97.16	99.00	98.61
	400	99.51	92.15	100.08	96.43	94.84	105.74	98.12
Compuesto 5	50	96.66	105.47	99.85	96.66	99.84	99.56	99.68
	600	96.22	92.31	94.78	99.17	97.89	97.97	96.39
	1000	96.79	93.85	101.07	96.58	101.33	96.74	97.73
Compuesto 6	50	97.66	100.37	98.56	97.66	97.04	97.68	98.16
	100	102.49	92.87	95.02	98.93	100.44	99.04	98.13
	400	100.74	94.19	98.69	98.62	97.94	96.66	97.81

En la Tabla 31 se presentan los datos de repetibilidad y en la Tabla 32 los valores de reproducibilidad del método para la cuantificación simultánea del compuesto 1 y sus metabolitos en plasma de ratón.

El método de cuantificación en plasma humano demostró ser exacto. Los resultados se muestran en la Tabla 33.

Tabla 34. Parámetros de regresión de las curvas para linealidad para los compuestos 1, 5 y 6.

Compuesto 1						
	Plasma humano			Plasma de ratón		
Día	m	b	r	m	b	r
1	0.00464606	0.0120655	0.99961006	0.00395593	-0.02301874	0.99706098
	0.00413484	0.04682968	0.99803579	0.00446644	-0.03622434	0.99359309
	0.00515109	-0.03578668	0.99893226	0.00443433	-0.08844751	0.99788626
2	0.00466149	-0.0653981	0.9976501	0.00357092	-0.06597546	0.99662107
	0.00454332	-0.05071392	0.99858586	0.00486842	-0.03960678	0.99573476
	0.00412947	-0.0132077	0.998493	0.0044183	-0.05903657	0.99904634
3	0.00418057	0.0073452	0.99968465			
	0.00458538	0.0072847	0.99957015			
	0.00431942	-0.05169021	0.99580459			
Promedio	0.00448352	-0.01591906		0.00428572	-0.05205157	
DE	0.00033229	0.03731737		0.00045422	0.02373019	
Compuesto 5						
	Plasma humano			Plasma de ratón		
Día	m	b	r	m	b	r
1	0.00551397	-0.20925714	0.99594648	0.00572332	-0.0327308	0.9986944
	0.00383845	0.20000922	0.99642326	0.00523497	0.03916409	0.99978083
	0.00561167	-0.0676775	0.99955641	0.00469815	0.17695414	0.99976851
2	0.00475214	0.15364505	0.99829942	0.00555362	-0.00748985	0.99929857
	0.00536204	-0.05897465	0.99669959	0.00505882	0.16725319	0.99510353
	0.00437057	0.00975319	0.99573098	0.0055662	0.20133041	0.9996177
3	0.00474935	0.091194	0.99838787			
	0.00697373	-0.13127354	0.99430856			
	0.00503799	-0.14839183	0.99770487			
Promedio	0.00513443	-0.01788591		0.00530585	0.09074686	
DE	0.00089257	0.14152848		0.0003844	0.10302582	
Compuesto 6						
	Plasma humano			Plasma de ratón		
Día	m	b	r	m	b	r
1	0.00501256	0.00876758	0.99727849	0.00522917	-0.01152862	0.99675949
	0.00452332	0.01820086	0.99675537	0.00552189	-0.05275403	0.99950454
	0.00475869	0.03673165	0.99773924	0.0048251	-0.03066809	0.9980143
2	0.00672956	-0.0852639	0.99659422	0.00691974	-0.13039639	0.99859587
	0.00630868	-0.06159733	0.99867379	0.0061848	-0.04182605	0.99902281
	0.00586456	-0.0659211	0.99689757	0.00654084	-0.05194147	0.99968028
3	0.0063181	-0.03647384	0.99997581			
	0.00673879	-0.04951033	0.99835692			
	0.0060857	-0.07526667	0.99884305			
Promedio	0.00581555	-0.03448145		0.00587026	-0.05318578	
DE	0.00084339	0.04459969		0.00080929	0.04082799	

Al comparar las pendientes e interceptos obtenidos en ambas matrices biológicas (plasma humano y plasma de ratón) se encontró que no existen diferencias significativas. Los datos se presentan en la Tabla 34.

7.7 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO PRELIMINAR DEL COMPUESTO 1 EN RATONES Balb/C.

Los perfiles farmacocinéticos obtenidos en el estudio preliminar se muestran en la Figura 22.

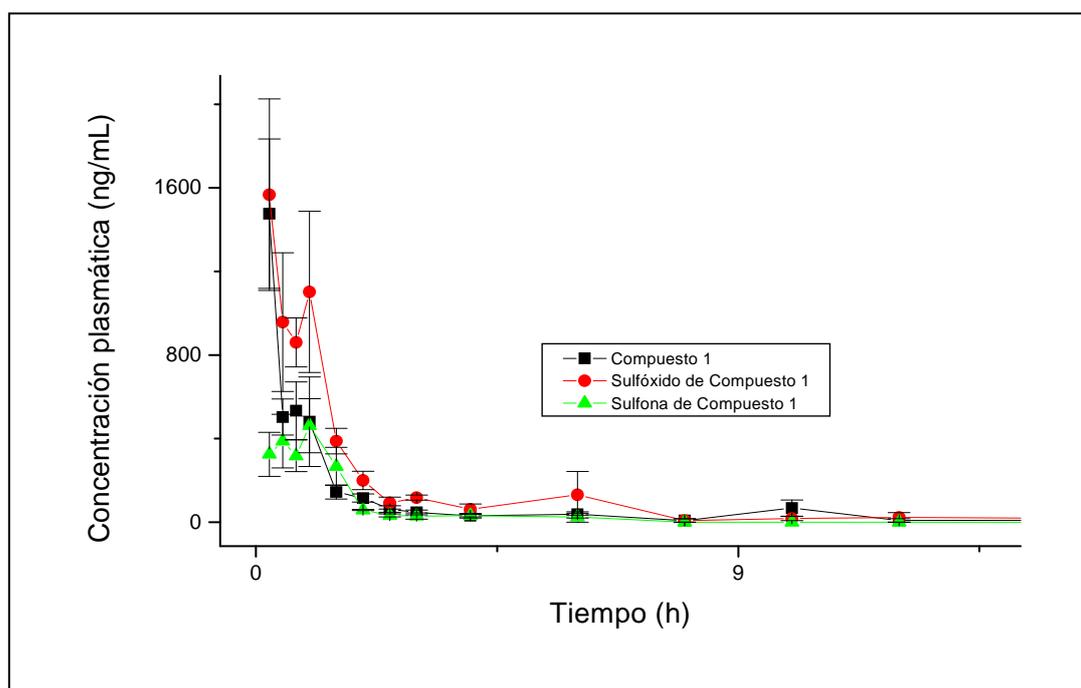


Figura 22. Perfil farmacocinético del compuesto **1** y sus metabolitos en ratones Balb/C en el estudio preliminar. Cada punto es el promedio de la concentración plasmática de cuatro ratones.

Desde el primer tiempo de muestreo (15 min) fue posible cuantificar los compuestos **1**, **5** y **6**. El compuesto **1** mostró las concentraciones más altas al tiempo mencionado, mientras que en tiempos posteriores se observó una rápida desaparición y después de 4 horas no fue posible cuantificarlo. Para el compuesto **5**, las concentraciones fueron menores a las del compuesto **1**, y de igual forma la desaparición de este fue rápida. En el caso del compuesto **6**, se encontraron concentraciones mucho menores que las de los compuestos anteriores y se observó que también dichas concentraciones disminuyen después de 4 horas. En la tabla 35 se presentan los parámetros farmacocinéticos del ajuste no compartimental.

Tabla 35. Ajuste no compartimental de los perfiles farmacocinéticos de los compuestos 1, 5 y 6 en el estudio preliminar.

Compuesto 1					
	Promedio	Desviación Estándar	Intervalo de confianza ($\alpha= 0.05$)	Min	Max
Ke (1/hr)	0.64	0.24	0.2402	0.4078	0.8883
T_{1/2} (hr)	1.20	0.36	0.3613	0.8422	1.5649
Tmax (hr)	0.43	0.32	0.3182	0.1192	0.7557
Cmax (ng/mL)	1491.08	609.48	597.28	893.79	2088.36
AUC_{INF} (hr*ng/mL)	1211.59	199.19	195.20	1016.38	1406.80
Vd/F (mL)	913.87	368.95	361.57	552.30	1275.44
Cl/F (mL/hr)	508.75	82.61	80.96	427.79	589.72
MRT_{INF} (hr)	1.59	0.38	0.3772	1.220	1.975
Compuesto 5					
Ke (1/hr)	0.79	0.31	0.3064	0.4847	1.0969
T_{1/2} (hr)	1.01	0.37	0.3687	0.6508	1.3884
Tmax (hr)	0.56	0.32	0.3182	0.2442	0.8807
Cmax (ng/mL)	1927.16	514.80	504.50	1422.65	2431.66
AUC_{INF} (hr*ng/mL)	1946.98	369.18	361.79	1585.19	2308.78
Vd/F (mL)	ND	ND	ND	ND	ND
Cl/F (mL/hr)	ND	ND	ND	ND	ND
MRT_{INF} (hr)	1.43	0.38	0.3771	1.055	1.810
Compuesto 6					
Ke (1/hr)	0.81	0.078	0.0773	0.73821642	0.89288358
T_{1/2} (hr)	0.85	0.083	0.0813	0.77650812	0.93924188
Tmax (hr)	0.68	0.20	0.2031	0.48436077	0.89063923
Cmax (ng/mL)	566.38	179.89	176.29	390.093329	742.681671
AUC_{INF} (hr*ng/mL)	697.79	156.86	153.72	544.070457	851.528643
Vd/F (mL)	ND	ND	ND	ND	ND
Cl/F (mL/hr)	ND	ND	ND	ND	ND
MRT_{INF} (hr)	1.34	0.059	0.0584	1.28401269	1.40098731

7.8 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO FINAL EN RATONES Balb/C.

La Figura 23 muestra los perfiles obtenidos después de la administración del compuesto **1** de ratones Balb/C. En este estudio se observa que de igual forma, se encuentran concentraciones plasmáticas de los compuestos **1**, **5** y **6** desde los primeros tiempos, dichas concentraciones disminuyen y después de 4 horas ya no son detectables.

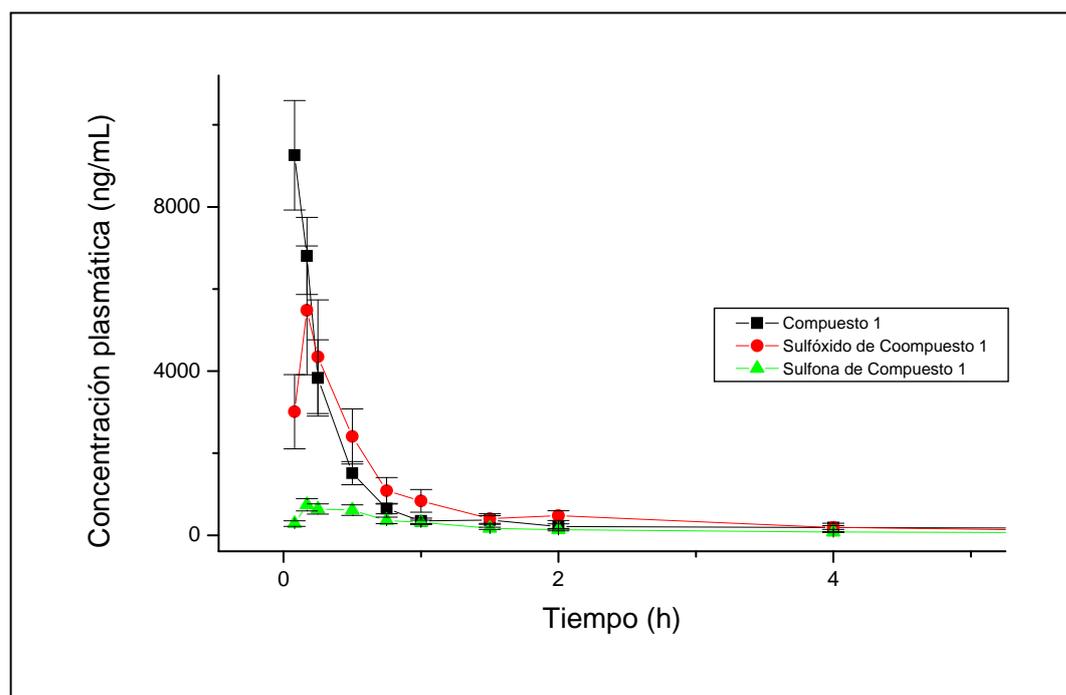


Figura 23. Perfil farmacocinético del compuesto 1 y sus metabolitos en ratones Balb/C en el estudio final. Cada punto es el promedio de la concentración plasmática de 6 ratones.

Se realizó el ajuste no compartimental (NC) de cada uno de los perfiles farmacocinéticos del estudio final con el software Winonlin ver 4.0 y se determinó el promedio, desviación estándar, y el intervalo de confianza ($\alpha= 0.05$) de dichos parámetros, para cada uno de los compuestos cuantificados. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 36.

Tabla 36. Ajuste No Compartimental del compuesto **1** y sus metabolitos compuesto **5** y **6**.

Compuesto 1					
	Promedio	Desviación Estándar	Intervalo de confianza ($\alpha= 0.05$)	Min	Max
Ke (1/hr)	1.07	0.46	0.4528	0.6255	1.5312
T_{1/2} (hr)	0.77	0.37	0.3634	0.4119	1.1388
Tmax (hr)	0.12	0.059	0.0585	0.0615	0.1785
Cmax (ng/mL)	10570.93	3489.06	3419.21	7151.72	13990.15
AUC_{INF} (hr*ng/mL)	3398.39	1189.72	1165.90	2232.48	4564.29
Vd/F (mL)	212.51	112.14	109.89	102.62	322.41
Cl/F (mL/hr)	192.59	52.50	51.45	141.13	244.05
MRT_{INF} (hr)	0.8468	0.4158	0.4075	0.4392	1.2543
Compuesto 5					
Ke (1/hr)	1.55	1.09	1.077	0.477	2.63
T_{1/2} (hr)	0.51	0.39	0.381	0.134	0.897
Tmax (hr)	0.16	0.075	0.074	0.086	0.235
Cmax (ng/mL)	5359.73	5233.55	5128.78	230.95	10488.51
AUC_{INF} (hr*ng/mL)	2983.74	2860.37	2803.11	180.63	5786.84
Vd/F (mL)	ND	ND	ND	ND	ND
Cl/F (mL/hr)	ND	ND	ND	ND	ND
MRT_{INF} (hr)	0.7789	0.5233	0.5128	0.2660	1.2918
Compuesto 6					
Ke (1/hr)	1.15	0.431	0.422	0.731	1.576
T_{1/2} (hr)	0.728	0.451	0.442	0.286	1.170
Tmax (hr)	0.236	0.096	0.094	0.142	0.330
Cmax (ng/mL)	802.00	487.18	477.42	324.57	1279.43
AUC_{INF} (hr*ng/mL)	859.47	374.25	366.75	492.71	1226.23
Vd/F (mL)	ND	ND	ND	ND	ND
Cl/F (mL/hr)	ND	ND	ND	ND	ND
MRT_{INF} (hr)	1.37	0.61	0.60	0.76	1.97

7.10 ADMINISTRACIÓN DE COMPUESTO 5 EN RATONES Balb/C

Después de la administración de compuesto **5** se encontraron concentraciones plasmáticas de compuesto **5** y **6** desde los primeros minutos. Las concentraciones de compuesto **5** fueron de 500 ng/mL y desaparecen en menos de 2 horas. El compuesto **6** muestra niveles plasmáticos menores que el compuesto **5** (250 ng/mL) y estos disminuyen, siendo no detectables a las 2 hrs. Los perfiles resultantes de la administración pueden apreciarse en la Figura 24.

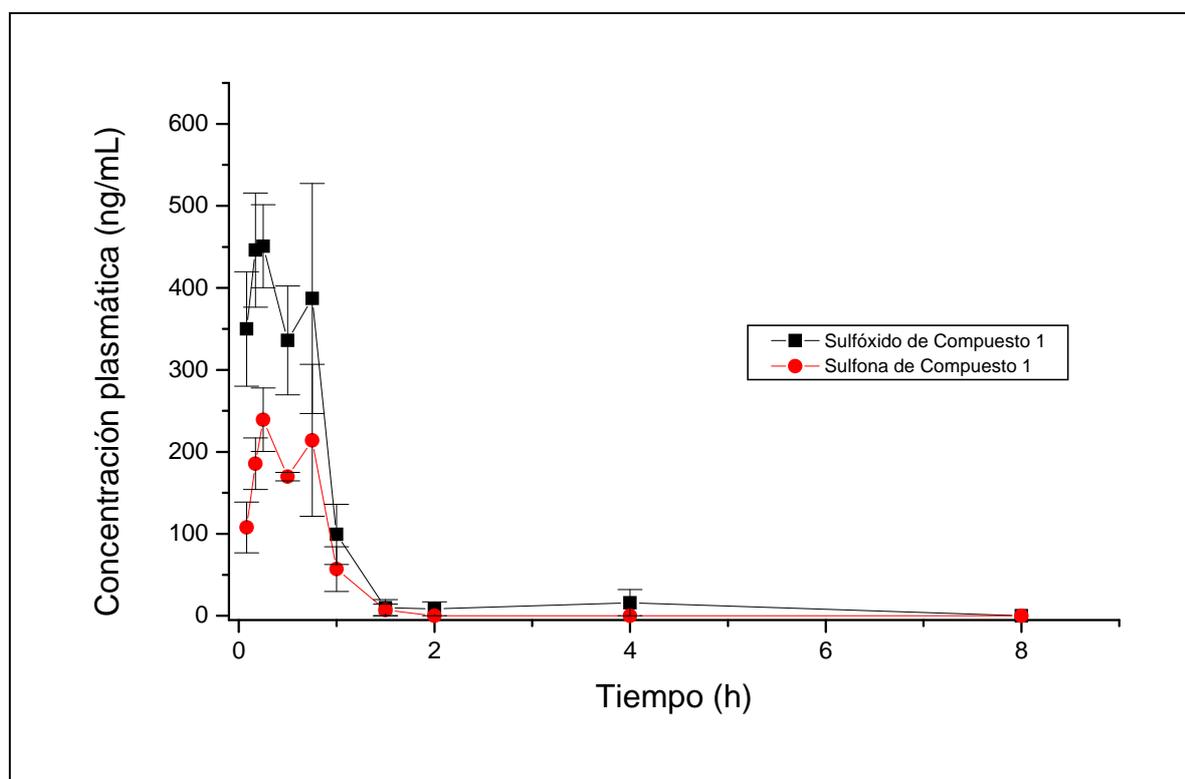


Figura 24. Perfiles farmacocinéticos después de la administración de Compuesto **5** en ratones Balb/C

En la Tabla 37 se encuentran los parámetros farmacocinéticos obtenidos después de la administración de compuesto **5**.

Tabla 37 Ajuste no compartimental de la administración de compuesto 5.

Compuesto 5					
	Promedio	Desviación Estándar	Intervalo de confianza ($\alpha=0.05$)	Min	Max
Ke (1/hr)	1.916	1.117	1.094	0.822	3.011
T_{1/2} (hr)	0.615	0.476	0.466	0.148	1.081
Tmax (hr)	0.210	0.040	0.039	0.171	0.249
Cmax (ng/mL)	442.358	84.367	82.678	359.679	525.036
AUC_{INF} (hr*ng/mL)	365.105	216.737	212.398	152.707	577.503
Vd/F (mL)	340.746	94.915	93.014	247.732	433.760
Cl/F (mL/hr)	557.658	225.257	220.747	336.911	778.406
MRT_{INF} (hr)	1.056	0.822	0.805	0.251	1.861
Compuesto 6					
Ke (1/hr)	2.33885	1.288	1.262	1.077	3.601
T_{1/2} (hr)	0.638625	0.680	0.667	-0.028	1.305
Tmax (hr)	0.2925	0.124	0.122	0.171	0.414
Cmax (ng/mL)	288.48	73.160	71.695	216.785	360.175
AUC_{INF} (hr*ng/mL)	231.77375	131.388	128.758	103.016	360.531
Vd/F (mL)	ND	ND	ND	ND	ND
Cl/F (mL/hr)	ND	ND	ND	ND	ND
MRT_{INF} (hr)	1.080325	1.044	1.023	0.057	2.104

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Para la realización de este trabajo, se desarrollaron y validaron los métodos analíticos utilizados para los estudios *in vitro* (solubilidad, coeficiente de partición y permeabilidad relativa en las líneas celulares Caco-2 y MDCK), e *in vivo* (estudio farmacocinético del compuesto 1 en ratones Balb/C). Los métodos para la cuantificación de los compuestos en los estudios *in vitro*, cumplieron con los parámetros de selectividad (Tabla 14, Figura 15), linealidad (Figura 16), precisión (Tabla 16 y 17) y exactitud (Tabla 18), por lo que se consideraron adecuados para ser utilizados en la evaluación de las propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas de los compuestos bajo estudio. Para los estudios *in vivo*, se validó el método por cromatografía de líquidos de alta resolución para la cuantificación simultánea de los compuestos **1**, **5** y **6** tanto en plasma humano como en plasma de ratón. Los resultados de la validación en plasma humano mostraron que el método permite determinar adecuadamente cada uno de los compuestos, pues se encuentran completamente separados y definidos (Figura 20). Se obtuvo un recobro absoluto de los compuestos **1**, **5** y **6** mayor al 99 %, con lo que se concluye que el método de extracción es adecuado (Tabla 25). De igual forma, el método cumplió con los criterios de precisión y exactitud marcados en la norma oficial, pues el CV % entre repeticiones en un mismo día y entre días fue menor al 15 % (Tabla 26 y 27), y la concentración recuperada en cada caso se encontró dentro del intervalo de ± 15 % del valor de la concentración nominal para los tres compuestos (Tabla 28). Los compuestos **1**, **5** y **6** mostraron ser estables en las condiciones evaluadas (Tabla 30 a, b, c y d).

Se verificó la linealidad (Figura 21), precisión (Tabla 31 y 32) y exactitud (Tabla 33) del método analítico al utilizar plasma de ratón, como matriz biológica. En este caso se cumplieron también los parámetros especificados por la norma oficial.

La comparación del desempeño de la cuantificación en ambos tipos de matrices se realizó mediante la prueba de t de Student, comparando las pendientes y los interceptos de las curvas de método. Los resultados de los valores de t y p obtenidos en cada comparación se presentan en la tabla 38, y puede apreciarse que no hay diferencias significativas entre ambas matrices, ya que en todos los casos p fue mayor a 0.05. De esta forma podemos utilizar indistintamente plasma humano o de ratón para cuantificar los compuestos **1**, **5** y **6**.

Tabla 38. Comparación de los métodos de cuantificación en plasma humano y de ratón mediante la prueba de t de Student.

Compuesto 1						
Parámetros promedio	Plasma humano	Plasma de ratón	Diferencia entre medias	Valor de t	Valor de p	*IC ($\alpha=0.05$)
Pendiente	0.00448352	0.00428572	0.000198	0.978	0.346	-0.000239 a 0.000635
Intercepto	-0.01591906	-0.05205157	-0.0361	2.092	0.057	-0.00117 a 0.0734
Compuesto 5						
Pendiente	0.00513443	0.00530585	-0.000171	-0.440	0.667	-0.00101 a 0.000671
Intercepto	-0.01788591	0.09074686	-0.109	-1.609	0.132	-0.254 a 0.0372
Compuesto 6						
Pendiente	0.00581555	0.00587026	-0.0000547	-0.125	0.902	-0.00100 a 0.000891
Intercepto	-0.03448145	-0.05318578	0.0187	0.822	0.426	-0.0305 a 0.0679

* IC: Intervalo de Confianza de la diferencia entre medias

8.1 SOLUBILIDAD

Los resultados de los estudios preliminares de solubilidad de los compuestos **1-4** y el ABZ obtenidos en nuestro estudio (Tabla 20), mostraron valores relativamente bajos en disolventes acuosos con pH cercano a 7 tales como el buffer de fosfatos pH 7.4, FIS con pH aproximado de 6.8 y agua destilada, (0.013 mg /mL para los compuestos **2** y **3** hasta 0.028 mg/mL para el compuesto **1**), mientras que en valores bajos de pH (FGS y HCL 0.1 M), la solubilidad presentó valores más altos (1.0 mg/mL para el compuesto **2** en FGS y 9.2 mg/mL para el compuesto **1** en HCl 0.1M). Los valores de solubilidad en disolventes orgánicos variaron de 0.3 y 2.8 mg/mL en CCl₄ hasta 25 y 58 mg/mL en DMSO para los compuestos **1** y **4** respectivamente. El incremento de la solubilidad en estos disolventes fue significativo, con lo que se infiere una naturaleza más lipofílica de los nuevos compuestos. El ABZ tuvo los valores más bajos de solubilidad en todos los disolventes.

La solubilidad preliminar de los compuestos **1-4** en disolventes orgánicos mostró una relación con la constante dieléctrica de dichos disolventes (Figura 25). De estas observaciones resalta el hecho de que los compuestos **1-4** presentan mayor solubilidad en disolventes con valores intermedios de constante dieléctrica (metanol, etanol y

DMSO), debido posiblemente a la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos de alta polaridad (OH y O⁻) de estos disolventes y los grupos hidrofílicos como los grupos amino y carbonilo en los derivados bencimidazólicos.

Esta relación indica que existen interacciones polares entre los nuevos derivados y las moléculas de disolvente; la solubilización se facilita al romper los enlaces por puente de hidrógeno intramoleculares del soluto al ser solvatado por el disolvente.

Estructuralmente, el ABZ tiene 2 grupos donadores y 2 grupos aceptores de puentes de hidrogeno, mientras que los compuestos **1-4** que solo presentan 1 grupo donador y 2 grupos aceptores. Dicha diferencia podría influir significativamente en la solubilidad requiriendo menos energía para disociarse, lo que se refleja finalmente en el grado de solubilización.

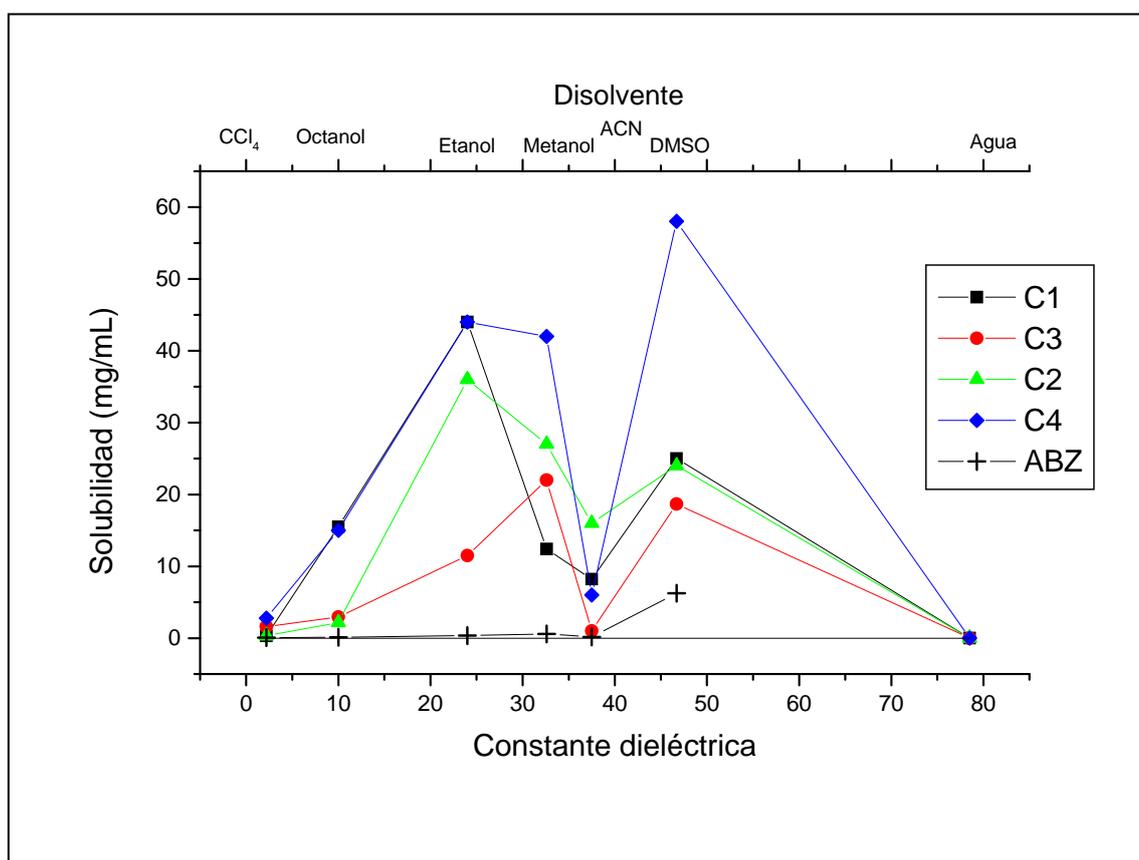


Figura 25. Relación entre la constante dieléctrica/polaridad de disolventes orgánicos y la solubilidad de los compuestos **1-4** y ABZ.

Es importante resaltar que la solubilidad de todos los compuestos fue más baja en ACN, lo cual puede deberse a que este disolvente presenta menor polaridad que los alcoholes por lo que los puentes de hidrógeno intramoleculares en el bencimidazol previenen la solvatación, y por lo tanto la solubilidad en este disolvente disminuye para

todos los compuestos en estudio. En forma semejante, las interacciones hidrofóbicas existentes entre las moléculas de estos compuestos impiden las interacciones polares entre las moléculas de agua y las del soluto, por lo que la solubilidad en agua es muy baja.

8.2 COEFICIENTE DE PARTICIÓN Y SOLUBILIDAD

El Log P obtenido para los compuestos **1-4** así como el ABZ (Tabla 23), confirma que estos presentan propiedades lipofílicas similares a otros bencimidazoles tales como el fenbendazol (3.93), MBZ (3.73), oxfendazol (2.6) y tiabendazol (2.5), (Mottier y cols. 2003). Dicha lipofílicidad coincide con el comportamiento detectado en las pruebas de solubilidad encontradas en nuestro estudio.

En muchos solutos cristalinos no electrolitos, la solubilidad muestra una relación directa con el coeficiente de partición octanol/agua y el punto de fusión, como muestra la ecuación 4, reportada por Yalkowski (1999).

$$\text{Log S} = 0.8 - \log K_{ow} - 0.1 (\text{MP} - 25) \dots \dots \text{ecuación 4}$$

donde log S, log K_{ow} y MP son la solubilidad molar, el coeficiente de partición octanol/agua y punto de fusión del soluto en cuestión. Al aplicar dicha ecuación a los compuestos **1-4** y ABZ, y al compararlos con los valores de solubilidad al equilibrio en agua a 25 °C (Tabla 21) se encontró que la solubilidad predicha para ellos (Tabla 39) es mayor en relación a la solubilidad observada, pero destaca la situación de que el ABZ presenta el menor valor de solubilidad. Es posible que las diferencias se deban a que la ecuación de Yalkowski no considera todas las posibles interacciones que existen entre moléculas, aunque dicha ecuación permite estimar de manera relativa el comportamiento de la solubilidad entre los diferentes compuestos analizados.

Tabla 39. Estimación de solubilidad acuosa de los compuestos 1-4 y ABZ utilizando la ecuación de Yalkowski.

Compuesto	1	2	3	4	ABZ
Peso Molecular (g/mol)	275	309	289	323	265
Punto de fusión (°C)	100	111	125	127	209
Log P	1.97	2.37	1.85	1.97	3.46

Solubilidad observada (mg/mL)	0.1277	0.0489	0.1482	0.0753	0.0024
Solubilidad predicha (mg/mL)	35.11	15.13	42.82	24.35	0.6360
Solubilidad molar observada	0.0004644	0.0001580	0.0005128	0.0002328	0.0000090
Solubilidad molar predicha	0.0120226	0.0037154	0.0089125	0.0064565	0.0000316

8.3 DETERMINACIÓN DEL pK_a

Los resultados de pK_a obtenidos indican que los nuevos compuestos son anfipróticos, pues no presentan ningún sustituyente en posición 1, permitiendo el equilibrio tautomérico del bencimidazol (Figura 26).

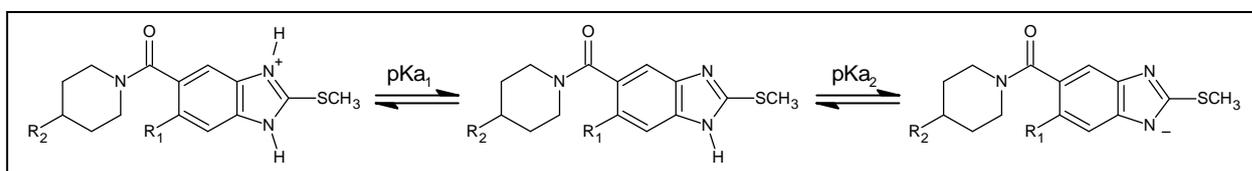


Figura 26. Equilibrio ácido-base de los compuestos 1-4.

Los valores correspondientes al pK_{a1} de estos compuestos (valores entre 3 y 4) pueden atribuirse a la protonación del grupo amino en posición 3 del núcleo bencimidazólico, mientras que el pK_{a2} con

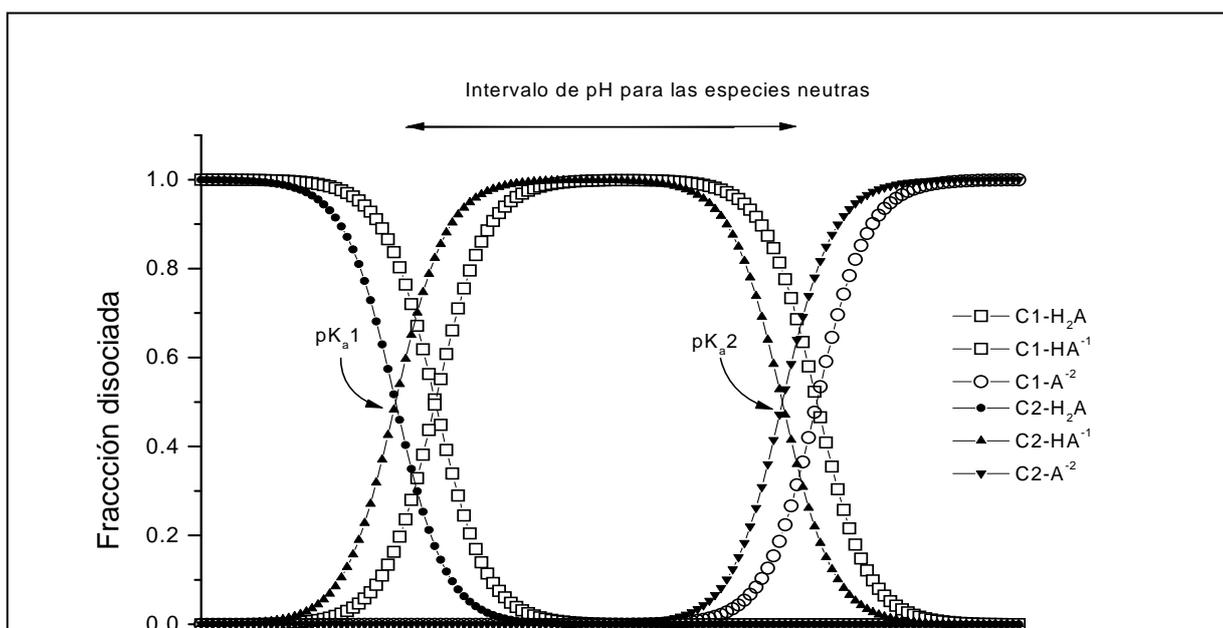


Figura 27. Diagrama de especiación de los compuestos **1** y **2** en función del pH. valores entre 10 y 10.6 se puede atribuir a la pérdida del protón del grupo amino en posición 1 (Tabla 22). Todos los compuestos presentan el mismo equilibrio de ionización, y aunque los valores de pK_a para los compuestos **2** y **4** son menores que los correspondientes a los compuestos **1** y **3** debido al efecto inductivo del átomo de Cl en posición 6, esta disminución no parece ser relevante en la solubilidad de los compuestos. La Figura 27 muestra la relación entre las especies cargadas y el pH, con lo que se sugiere que entre un pH de 5 y 9 estos compuestos permanecen como especies neutras, y podrían ser absorbidas ampliamente en la región intestinal.

8.4 COEFICIENTE DE PERMEABILIDAD RELATIVA

La permeabilidad relativa (P_{app}) de los compuestos **1-4** y ABZ se evaluó utilizando la línea Caco-2, la cual presenta una buena correlación con la fracción absorbida en humanos, y la línea MDCK la cual requiere tiempos menores de preparación que la línea Caco-2.

La evaluación de P_{app} en dirección apical-basolateral (AB) muestra que los compuestos **1-4** se transportan de forma semejante al estándar de alta absorción (propranolol, 90 % de absorción en humanos) en ambas líneas celulares (Tabla 24), con lo que se puede afirmar que todos estos compuestos son altamente permeables.

Los resultados P_{app} (AB) presentan concordancia con el Log P y Clog P respectivos, lo que indica que estos compuestos podrían ser ampliamente absorbidos en el intestino delgado, sitio donde se encontrarían en su forma no ionizada y consecuentemente podrían tener una alta biodisponibilidad. El ABZ mostró un valor de P_{app} bajo, lo cual contrasta con la alta lipofilidad predicha por el valor de Log P. En estudios previos, Kobayashi y cols (2001), encontraron que el ABZ presentaba valores variables de P_{app}

utilizando un sistema continuo de disolución/permeabilidad. Se concluyó que la causa de dicha variabilidad era la acumulación del compuesto originada por la precipitación de este durante el ensayo. La precipitación se presentó por la baja solubilidad del ABZ en un medio con pH de 6.8, sobreestimando la permeabilidad del compuesto. En nuestro estudio no se verificó que hubiera fármaco precipitado, aunque cabe la posibilidad de que precipitara, ya que el pH de trabajo fue de 7.4. Con estas observaciones confirmamos que las moléculas de ABZ no se disocian completamente en un disolvente polar como el agua, por lo que no se encuentra totalmente disponible para ser transportado a través de las membranas celulares.

Al comparar el transporte basolateral-apical (BA) con el transporte AB mediante la relación BA/AB, esta relación muestra valores mayores a 1 para todos los compuestos, indicando que probablemente la magnitud del transporte BA (efflux) es mayor que la entrada (influx).

Este parámetro nos permite detectar la presencia de mecanismos de transporte activo, los cuales polarizan el transporte de fármacos, a diferencia del transporte por difusión pasiva. Se han reportado diferentes tipos de transportadores especializados para fármacos como son la glicoproteína P y la proteína de resistencia a cáncer (ABCG2/BCRP), que intervienen en gran medida en el transporte de moléculas con actividad terapéutica. En un estudio previo, Merino y cols (2005) encontraron que el sulfóxido de ABZ y el oxfendazol fueron transportados por la proteína de resistencia a cáncer (ABCG2/BCRP), sin embargo no se ha encontrado alguna asociación entre el ABZ a BCRP o glicoproteína P.

8.5 ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DEL COMPUESTO 1

Considerando que en estudios previos de actividad contra *T. spirallis*, el compuesto **1** mostró una eficacia semejante a la del ABZ (Tabla 6), que es un compuesto de alta permeabilidad y que únicamente cuenta con un sustituyente en posición 5(6) del anillo bencimidazólico (Tabla 6), se eligió a este compuesto como la molécula representativa de la serie para realizar un estudio farmacocinético en ratones Balb/C.

De los estudios *in vivo*, se puede resaltar que después de la administración de compuesto **1** a ratones Balb/C, se detectaron concentraciones plasmáticas altas desde los primeros tiempos de muestreo, tanto en el estudio preliminar como en el estudio final.

En ninguno de los estudios realizados se pudo caracterizar la fase de absorción (Figuras 22 y 23). Ello permite asumir que la absorción de compuesto **1** es rápida, favorecida por la administración del compuesto en solución. A pesar de haber utilizado la misma dosis en ambos estudios, en el estudio preliminar se alcanzaron las concentraciones más altas. Se ha reportado que un ratón con peso promedio de 20 g presenta un volumen acuoso corporal total de 12 mL (Páez, 2003). Los valores de la relación V_d/F encontrados en nuestros estudios (212.5 mL) muestran que el compuesto **1** podría presentar una amplia distribución en el organismo de los ratones Balb/C. El tiempo de vida media encontrado (0.77 y 1.2 h) indica que el compuesto se elimina rápidamente. El tiempo medio de residencia (TMR) muestra de igual forma una eliminación rápida (Tablas 35 y 36).

El compuesto **5** también se detectó en plasma desde los primeros tiempos de muestreo, alcanzando concentraciones plasmáticas de 1.9 a 5.3 $\mu\text{g/mL}$. Es relevante mencionar que este compuesto presenta una fase de aparición entre los 5 y 10 minutos, con un valor de T_{max} de 0.16 h (9.6 min) en el estudio final (Tabla 36). Estos resultados muestran que, al igual que otros bencimidazoles, el compuesto **1** se metaboliza rápidamente para formar el sulfóxido.

Rawden y cols. (2000) encontraron que el Albendazol es metabolizado a sulfóxido por la acción de la Flavin monooxigenasa y el CYP3A4 presentes en intestino e hígado. Es probable que el metabolismo del compuesto **1** se lleve a cabo por la misma vía.

El compuesto **6**, al igual que los compuestos **1** y **5**, pudo ser cuantificado a partir de los primeros minutos de muestreo, sin embargo las concentraciones plasmáticas fueron significativamente más bajas (Figura 22 y 23). El T_{max} fue de 0.23 a 0.29 h (13.8-17.4 min), alcanzando concentraciones máximas de 0.506 a 0.802 $\mu\text{g/mL}$. Los valores del área bajo la curva fueron más bajos que para los otros compuestos, lo cual indica que el compuesto **6** se forma en menor cantidad (Tabla 35 y 36). Es probable que este compuesto proceda del metabolismo del compuesto **5**, ya que de acuerdo a lo reportado previamente por Rawden y cols (2000) y Virkel y cols (2006), en derivados bencimidazólicos el sulfóxido es transformado a su respectiva sulfona por acción del complejo enzimático CYP 450 a nivel hepático. La eliminación de este derivado fue rápida y después de 4 h no fue detectable con una vida media de eliminación entre 1.0 y 1.38 h.

El estudio de administración directa de compuesto **5** mostró que éste es rápidamente absorbido (Figura 24), y se distribuye ampliamente en el organismo del ratón ($V_d/F=340.76$ mL) El tiempo de vida media de 0.615 h, confirma una eliminación rápida del organismo. El compuesto **6** presentó el mayor valor de T_{max} (Tabla 37), lo cual podría confirmar que este compuesto se forma a partir del compuesto **5** a nivel sanguíneo.

En estudios previos se ha reportado que la administración oral de ABZ en diferentes especies, la fracción absorbida de ABZ es transformada en su totalidad a sulfóxido, de forma que prácticamente no se encuentra el fármaco en el torrente sanguíneo, siendo el sulfóxido la especie química predominante (García, 2003). En nuestro estudio, la relación de área bajo la curva (Área metabolito/Área compuesto **1**) fue de 0.87 para el compuesto **5** y 0.25 para el compuesto **6**, lo cual indica que aun cuando el compuesto **1**, se metaboliza a sulfóxido, es posible encontrar concentraciones mayores del compuesto que la de los metabolitos; adicionalmente, tanto el compuesto **1** como sus metabolitos, presentan una vida media muy corta (1 h), comparada con la vida media reportada para el sulfóxido de ABZ en ratones (2 h), por lo que sería conveniente evaluar la farmacocinética en otras especies con el propósito de verificar el comportamiento de este nuevo derivados en comparación con el ABZ.

9. CONCLUSIONES

- Los nuevos compuestos derivados bencimidazólicos fueron más solubles que el ABZ en disolventes orgánicos y acuosos.
- Los compuestos bajo estudio presentan mejor permeabilidad que el ABZ, en células Caco-2 y MDCK.
- Los datos de Log P y Papp en células Caco-2 indican que estos compuestos podrían ser altamente absorbidos *in vivo*, aunque podría estar también involucrado algún tipo de transporte activo.
- En ratón, el compuesto **1** presenta niveles plasmáticos desde los primeros tiempos de muestreo, por lo que se sugiere una absorción muy rápida a ni vel intestinal.
- El compuesto **1** se metaboliza a sulfóxido y sulfona, presumiblemente por la misma vía que el ABZ y el TCB.
- Por sus características de mayor solubilidad y alta permeabilidad, los compuestos son promisorios para continuar con su investigación preclínica.

10. PERSPECTIVAS

- Determinar si estos compuestos presentan un proceso de absorción mediante un mecanismo de transporte activo o pasivo.
- Evaluar el comportamiento farmacocinético en otras especies para establecer el potencial terapéutico de estas moléculas.
- Evaluar la biodisponibilidad y actividad de los nuevos derivados en modelos *in vivo* de forma simultánea, y realizar la correspondiente comparación con la biodisponibilidad y actividad del ABZ en el mismo modelo de estudio.
- Realizar estudios de toxicidad de los nuevos derivados a corto plazo en modelos *in vitro*.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Albert, A., Serjeant, E.P. (1971). The determination of ionization constants: A laboratory manual. 2nd Ed. Great Britain. *Chapman and Hall*, 44-64.
- Artursson, P., Karlsson, J. (1991); Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175 (3), 880-884.
- Balimane, P.V., Chong, S., Morrison, R.A. (2000); Current Methodologies Used for Evaluation of Intestinal Permeability and Absorption. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods.* 44, 301-312.
- Beech, R. N., Prichard, R. K., Scott, M. E.; (1994); Genetic variability of the tubulin genes in benzimidazole-susceptible and-resistant strains of *Haemonchus contortus*; *Genetics*, 138: 103-110.
- Botero David; Restrepo Marcos; (1999); Parasitosis Humanas, *Corporación para Investigaciones Biológicas; Medellín, Colombia; Tercera Edición*, 89-201.
- Brindley, Paul J., Sher, Alan; (1987); The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response; *The Journal of Immunology*, 139 (1), 215-220.
- Camenischs, G., Folkers, G., Waterbeemd, H. (1997); Comparison of passive drug transport through Caco-2 cells and artificial membranes. *International Journal of pharmacology*, 147, 61-70.
- Campbell, W.C., (1990); Benzimidazole; Veterinary uses; *Parasitology Today* 6(4), 130-133.
- Cook, G.C. (1990); Use of Benzimidazole Chemotherapy in Human Helminthiases: Indications and Efficacy. *Parasitology Today*, 6 (4), 133-16.
- Dawson, M.; Braithwaite, P.A.; Roberts, M.S.; Watson, T.R.; (1985); The pharmacokinetics and bioavailability of a tracer dose of [3H]-mebendazole in man. USP Indexed drugs; *British Journal of Clinical Pharmacology*, 19(1), 79-86.
- Dayan, A.D.; (2003); Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, 89, 141-159.
- Fairweather , I.; (2005) ; Triclabendazole: new skills to unravel an old(ish) enigma. Review; *Journal of Helminthology*, 79(3), 227-34.

- Fargetton, X., Galtier, P., Delatour, P., (1986); Sulfoxidation of Albendazole by a cytochrome P450-independent monooxygenase from rat liver microsomes. *Veterinary Research Communications*, 10, 317–324.
- Formentini, E. A.; (2005); Pharmacokinetics behaviour of ricobendazole in calves and sheep alter its intravenous administration; *Revue de Médecine Vétérinaire*. I, 37-42
- Gans, P., Sabatini, A., Vacca, A.; (1999); Determination of equilibrium constants from spectrophotometric data obtained from solutions of known pH : the program pHab; *Annali Di Chimica*, 89, 45-49.
- García, J.J, Bolás, F., Torrado, J.J. (2003); Bioavailability and efficacy characteristics of two different oral liquid formulations of Albendazole; *International Journal of Pharmaceutics*, 250, 351-358.
- Gilles, Herbert M.; Hoffman, Paul S.; (2002); Treatment of intestinal parasitic infections: a review of nitazoxanide. *Trends in Parasitology*, 18 (3), 95-97.
- Gokbulut, C., Akar, F., McKellar, Q.A.; (2006); Plasma disposition and faecal excretion of oxfendazole, fenbendazole and Albendazole following oral administration to donkeys; *The Veterinary Journal*, 172 (1), 166-172.
- Gottschall, D.W.; Theodorides, V.J.; Wang, R.; (1990); The metabolism of benzimidazole anthelmintics; *Parasitology Today* 6 (4), 115-124.
- Guidance for Industry; (2000); Waiver of In Vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER)
- Gupta, S., Khan, A.M., Jain, M. K., Katiyar, J. C. (1990); Anthelmintic profile of methyl 5(6)-(4-methylpiperidin-1-yl) carbonylbenzimidazol-2-carbamate in experimental helminthiases, *Indian Journal of Experimental Biology*, 28, 475-479.
- Horton, R.J., (1990); Benzimidazoles in a Wormy World, *Parasitology Today*, 6 (4), 106.
- Jonker, J.W., Smith, J.W., Brinkhuis, R.F., Maliepaard, M., Beijnen, J.H., Schellens, J.H., Schinkel, A.H; (2000); Role of Breast cancer resistance protein in the bioavailability and fetal penetration of topotecan; *Journal of the National Cancer Institute*, 92 (820), 1628-1629.
- Jung, H., Medina, L., García, L., Fuentes, I., Moreno-Esparza, R. (1998); Absorption Studies of Albendazole and Some Physicochemical Properties of the Drug and its Metabolite Albendazole Sulphoxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50, 43-48

- Kasim, Nehal A.; Whitehouse, Marc; Ramachandran, Chandrasekharan; Bermejo, Marival; Lennernas, Hans; Hussain, Ajaz S.; Junginger, Hans E.; Stavchansky, Salomon A.; Midha, Kamal K.; Shah, Vinod P.; Amidon, Gordon L.; (2004) Molecular properties of WHO essential drugs and provisional Biopharmaceutical Classification; *Molecular Pharmaceutics*, 1 (1), 85-96
- Kinabo, L.D.B., Bogan J.A.; (1989); Disposition of Triclabendazol in horses, ponies and donkeys; *Equine veterinary Journal*, 21, (4), 305-307.
- Kobayashi, M., Sada, N., Sugawara, M., Iseki, K., Miyazaki, K., (2001); Development of a new system for prediction of drug absorption that takes into account drug dissolution and pH change in the gastro-intestinal tract. *International Journal of Pharmaceutics*, 221, 87–94.
- Korolkovas, Andrejus; (1970), Essentials Molecular Pharmacology; USA, John Wiley and Sons Inc., 151-163.
- Lacey E, Gill J.H.; (1994); Biochemistry of benzimidazole resistance; *Acta Trop.* 56(2-3):245-62
- Lacey, E. ;(1990) Mode of action of benzimidazole; *Parasitology Today*, 6 (4), 112-115.
- Lacey, E., Watson, T.R.; (1985) Structure–activity relationships of benzimidazole carbamates as inhibitors of mammalian tubulin, in vitro; *Biochemical Pharmacology*, 34 (7), 1073-1077.
- Lanusse, C.E., Gascon, L.H., Prichard, R.K.; (1995); Comparative plasma disposition kinetics of Albendazole, fenbendazole, oxfendazole and their metabolites in adults sheep; *Journal of Veterinary and Pharmacology and Therapeutics*; 18 (3), 196-203.
- Mansour, Tag. E.; (2002); Chemotherapeutics targets in parasites: contemporary strategies; *Cambridge University Press. U.K.*, 33-54
- McKellar, Quintin A.; Jackson, Frank; (2004); Veterinary anthelmintics: old and new. *Trends in Parasitology*; 20 (10), 456-461.
- Merino, G., Alvarez, A., Prieto, J., Kim, R.B.; (2002); The anthelmintic agent Albendazole does not interact with P-glycoprotein; *Drug Metabolism and Disposition*: 30 (4), 365-369.
- Merino, G., Jonker, J., Wagenaar E., Pulido, M., Molina, A., Alvarez, A., Shinkel, A.H.; (2005); Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Drug Metabolism and Disposition*; 33(5), 614-618.
- Moroni, P., Buronfosse, T., Longin-Sauvageon, C., Delatour, P., Benoit, E.; (1995); Chiral sulfoxidation of Albendazole by the flavin adenine dinucleotide-containing and cytochrome P450-dependent monooxygenases from rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, 23, 160–165.

- Mottier, M.L.; Alvarez, L.I.; Pis, M.A., Lanusse, C.E.; (2003); Transtegumental diffusion of benzimidazole anthelmintics into *Moniezia benedeni*: correlation with their octanol–water partition coefficients; *Experimental Parasitology*, 103, 1–7.
- Newton, S. E.; Meeusen, E. N. T.; (2003); Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep *Parasite Immunology*, 25, 283–296.
- Páez, X., Mazzei-Dávila, C., Quiñónez, B.; Cambios en aminoácidos luego de administración intraperitoneal de veneno del escorpión *Tityus zulianus* en ratones: Estudio con microdiálisis subcutánea y electroforesis capilar. *Investigación clínica* 2003, 44 (4), 291-302.
- Rawden, H.C., Kokwaro, G.O., Ward, S.A., Edwards, G.; (2000); Relative contribution of cytochrome P-450 and .avine-containing monooxygenases to the metabolism of Albendazole by human liver microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 49 (4), 313–322.
- Rigter, I. M.; Schipper, H. G.; Koopmans, R. P.; van Kan, H.J.; Frijlink, M. H. W.; Kager, P. A.; Guchelaar, H.-J.; (2004); Relative bioavailability of three newly developed Albendazole formulations: a randomized crossover study with healthy volunteers; *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48 (3), 1051–1054.
- Sangster, N.C.; (1999); Anthelmintic resistance: past, present and future; *International Journal of Parasitology* 29 (1). 137-138
- Sanyal, P. K., Gupta, S.C.; (1996); Efficacy and Pharmacokinetics of Triclabendazole in Buffalo with Induced Fasciolosis. *Veterinary Parasitology*, 63, 75-82
- Sanyal, P.K.; (1995); Kinetic disposition of triclabendazole in buffalo compared to Cattle; *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 18, 370-374
- Scarcella, S., Ceriani C., Rodríguez J.A., Solana H. D.; (2007); Caracterización de la proteína microtubular de diferentes helmintos parásitos. Sus implicancias en el modo de acción de los benzimidazoles antihelmínticos; *Revista electrónica de Veterinaria*; VIII (6) 1695-7504.
- Schwab A. E., Boakye, D. A., Kyelem D., Prichard R. K; (2005); Detection of benzimidazole resistance–associated mutations in the filarial nematode *Wuchereria bancrofti* and evidence for selection by albendazole and ivermectin combination treatment; *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 73 (2) 234–238.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (1999); Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.
- Secretaría de Salud (2000); Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 7ª Edición, México.

- Secretaría de Salud, (1998); Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998; México.
- Sharma, Satyavan; (1994); Design of new drugs for helminth diseases: lead optimization in benzimidazoles; *Advances in Drug Research*, 25, 103-172.
- Soria-Arteche O. Castillo, R., Hernández-Campos, A., Hurtado-de la Peña, M., Navarrete-Vázquez, G., Medina-Franco, JL, Gómez-Flores, K.; (2005); Studies on the selective S-oxidation of Albendazole, fenbendazole, triclabendazole, and other benzimidazole sulphides; *Journal of Mexican Chemistry Society*, 49(4), 349-354.
- Souhaili-El Amri, H., Mothe, O., Totis, M., Masson, C., Batt, A.M., Delatour, P., Siest, G., (1988); Albendazole sulfonation by rat liver cytochrome P-450c. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 246 (2), 758–764.
- Tay Zavala, Jorge; Gutiérrez Quiroz, Manuel; López Martínez Rubén; Manjares Zavala Eugenia; Molina López José; (2003); Microbiología y Parasitología Médicas: Méndez Editores; México, 3^a Edición. 439-447.
- Thomaz-Soccol, Vanete; Pohl de Souza, Felipe; Sotomaior, Cristina; Alcântara Castro, Edilene; Milczewski, Viviane; Mocelin, Giovanni; do Carmo Pessoa e Silva, Maria; (2004); Resistance of gastrointestinal nematodes to anthelmintics in sheep (*Ovisaries*); *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 47 (1), 41-47.
- Townsend, L.B.; Wise, D.S.; (1990); The synthesis and chemistry of certain anthelmintic benzimidazoles, *Parasitology Today*, 6 (4), 107-111.
- United States Pharmacopoeia; (2002); XXVI Edition; USA.
- van De Waterbeemd, H., Smith, D.A., Beaumont, K., Walker, D.K.; (2001); Property-based design: optimization of drug absorption and biopharmaceutics; *Journal of Medicinal Chemistry* 44(9), 1313-33.
- Villaverde, C., Alvarez, A.I., Redondo, P., Voces, J., del Estal, J.L., Prieto, J.G., (1995); Small intestinal sulphoxidation of Albendazole. *Xenobiotica* 25, 433–441.
- Virkel, G., Lifschitz, A., Sallovitz J., A., Pis, C., Lanusse, J.; (2006); Assesment of the main metabolism pathways for the flukicidal compound triclabendazol in sheep; *Journal of Veterinary Pharmacology Therapeutics*, 29, 213-223.
- von Richter, Oliver; Burk, Oliver; Fromm, Martin F.; Thon, Klaus P.; Eichelbaum, Michel; Kivisto, Kari T.; (2004); Cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein expression in human small intestinal enterocytes and hepatocytes: A comparative analysis in paired tissue specimens; *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 75(3), 172-83.

- Yalkowski, S.H.; Valvoni, S.C.; Roseman, T.J.; (1983); Solubility and partitioning VI: Octanol solubility and octanol-water partition coefficients. *J. Pharm. Sci*, 72 (8), 366-370.
- Yalkowsky, S. H.; (1999); Solubility and Solubilization in aqueous media, Oxford *University Press Inc.* USA, 67-68.
- Zhu, B.T.; (1999); A novel hypothesis for the mechanism of action of P-glycoprotein as a multidrug transporter; *Molecular Carcinogenesis*, 25(1); 1-13.