



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

**EVALUACIÓN *IN VIVO* E *IN VITRO* DE
FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL SOLUBILIZADO
CON CICLODEXTRINAS**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS**

P R E S E N T A

Javier Arturo Munguía Xóchihua

**Tutor: Froylán Ibarra Velarde
Comité Tutorial: Héctor Quiroz Romero
Rafael Castillo Bocanegra**

México, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

JURADO DE EXÁMEN DE GRADO DE DOCTOR

Presidente: Dra. Maria Teresa Quintero Martínez.

Secretario: Dr. Froylán Ibarra Velarde.

Vocal: Dra Irene Cruz Mendoza.

Vocal: Dr. Rafael Castillo Bocanegra.

Vocal: Dr. David Quintanar Guerrero.

DECLARACIÓN

Esta tesis Doctoral es el resultado del trabajo de investigación del autor, en ella se da el reconocimiento a las fuentes de información consultadas.

El autor da su consentimiento a la División de estudios Superiores de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que esta tesis este disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio académico bibliotecario.

JAVIER ARTURO MUNGUÍA XÓCHIHUA

DEDICATORIAS

A mi esposa Nora Patricia Gómez Amaya (Mami) y mis hijos Javier Alberto Munguía Gómez (Chito), Luis Felipe Munguía Gómez (LuisFe) y Carlos René Munguía Gómez (Ñangas) por su apoyo incondicional en esta etapa de mi formación profesional y por permitirme tomar un tiempo que a ellos les correspondía, mil gracias.

A mis padres Vicente Munguía Soto y Blanca Elena Xóchihua de Munguía, por darme los valores que forjaron mi carácter, motivar y apoyar mi superación profesional.

A mis hermanos Leonardo Munguía Xóchihua (Mosura), Vicente Munguía Xóchihua (Nin) y María del Refugio Munguía Xóchihua (Cuqui) por su apoyo incondicional y motivación a concluir esta formación, muchas gracias.

A todos mis amigos y compañeros que de una forma u otra colaboraron en mi formación personal y profesional, muchas gracias.

AGRADECIMIENTOS

Al programa de mejoramiento del profesorado (PROMEPE) por la beca otorgada para realizar los estudios de doctorado.

Al Instituto Tecnológico de Sonora por su apoyo para realizar los estudios de doctorado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por darme la formación profesional durante los estudios de licenciatura, Maestría y Doctorado. A mi Alma Mater, muchas gracias.

A proyecto PAPIIT-DEGPA-UNAM clave IN 207106-3, por el valioso apoyo económico otorgado para el desarrollo de esta tesis.

Al Dr. Froylán Ibarra Velarde, tutor principal, profesor Titular y jefe del Departamento de Parasitología de la Universidad Nacional Autónoma de México, quien asesoró, colaboró y aportó su gran experiencia para realizar los objetivos y metas planteadas en este doctorado.

Al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, Dr. Francisco Luis Hernández y la Dra. Alicia Hernández Campos, profesores de la Facultad de Química de la UNAM, por su aportación a la realización del proyecto doctoral, así como su invaluable amistad, asesoría y apoyo en la síntesis y elaboración del compuesto Alfa.

A mi comité tutorial y miembros del jurado de examen de grado de doctor conformado por los Doctores Froylán Ibarra Velarde, Rafael Castillo Bocanegra y Héctor Quiroz Romero. Quienes me apoyaron y orientaron con sus comentarios, recomendaciones y revisión de los informes semestrales, así como en la tesis en su versión final.

A los Doctores René Rosiles M. y Janitzio Ordoñez por su por su aportación a la realización del proyecto doctoral, así como su invaluable amistad, asesoría y apoyo en los análisis en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

A los Doctores Rafael Hernández y Oscar Villanueva Sánchez de la Unidad de Bioterio del Hospital de nutrición “Salvador Suribán” por su apoyo para permitirme el uso de las instalaciones para concretar el experimento en conejos y su valiosa aportación científica.

A los Doctores Enrique Pinzón Estrada, Ismael Torres Saldaña y Víctor Manuel Salgado Alfaro de la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, por su apoyo en la aportación de material biológico y sus conocimientos para el uso y manejo de animales de laboratorio, que permitió cumplir los objetivos del proyecto.

Al Dr. Víctor Manuel Salgado Alfaro por ser un pilar importante en la realización y terminación del proyecto doctoral. Las palabras que se pongan para agradecer su invaluable apoyo y amistad son insuficientes, solo hay una palabra fácil de decir pero difícil de sentir, gracias...

A la Maestra Adriana Ducoing Watty, profesor del Departamento de Genética y Bioestadística de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México por su invaluable asesoría en los análisis estadísticos.

Al Dr. Jorge Cantó Alarcón profesor de la Universidad Autónoma de Querétaro, por su amistad y apoyo para concertar el experimento en ovinos.

Al comité de grado formado por la Dra. Maria Teresa Quintero Martinez, Dr. Froylán Ibarra Velarde, Dra. Irene Cruz Mendoza, Dr. Rafael Castillo Bocanegra y Dr. David Quintanar Guerrero por sus acertadas observaciones para mejorar la tesis y ser parte de mi formación de Doctor en esta máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México.

CONTENIDO

TEMA	PÁGINA
RESUMEN.....	i
ABSTRACT.....	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1. <i>Fasciola hepatica</i>	1
I.1.1. Morfología.....	1
I.1.2. Ciclo biológico.....	2
I.1.3. Patogenia	3
I.1.4. Epidemiología de Fasciolosis en México.....	5
I.1.5. Impacto económico de la fasciolosis	6
I.2. ANTECEDENTES DE QUIMIOTERAPÉUTICOS.....	7
I.2.1. Quimioterapia contra <i>Fasciola hepatica</i>	7
I.2.2. Antihelmínticos bencimidazoles.....	8
I.3. EL COMPUESTO ALFA	9
I.3.1. Antecedentes del compuesto Alfa.....	9
I.3.2. Síntesis del compuesto Alfa.....	9
I.3.3. Información técnica.....	10
I.3.4. Propiedades químicas del compuesto Alfa.....	11
I.3.4.1. Estudios toxicológicos.....	11
I.3.5. Mecanismo de acción.....	11
I.3.6. Determinación de dosis máxima tolerada e índice de seguridad del compuesto Alfa en bovinos.....	12
I.3.7. Excreción de residuos del compuesto Alfa en leche	12
I.3.8. Eficacia del compuesto Alfa contra fasciolas de 4 y 10 semanas.....	12
I.3.9. Determinación de la dosis efectiva en bovinos.....	13
I.3.10. Estudios de farmacocinética.....	13
I.3.10.1. En ovinos.....	13
I.3.10.2. En bovinos.....	13
I.3.11. Estudios quimioterapéuticos.....	14

I.3.11.1. En ovinos.....	14
I.3.11.2. En bovinos.....	15
I.4. GENERALIDADES EN LA SOLUBILIDAD DE COMPUESTOS.....	15
I.4.1. Compuestos sólidos hidrofóbicos e hidrofílicos.....	16
I.4.2. Consideración del tamaño de la partícula.....	17
I.4.3. Estabilidad de suspensiones.....	18
I.4.4. Desarrollo de nuevas formulaciones.....	19
I.4.5. Las suspensiones parenterales.....	20
I.4.6. Inyección intramuscular (IM).....	21
I.4.7. Consideraciones en la formulación intramuscular del compuesto Alfa.....	22
I.5. VEHÍCULOS UTILIZADOS EN LA FORMULACIÓN DEL COMPUESTO ALFA.....	24
I.5.1. Ciclodextrinas.....	24
I.5.1.1. Características de las ciclodextrinas.....	24
I.5.1.2. Clasificación de las ciclodextrinas.....	24
I.5.1.3. Usos de las ciclodextrinas.....	25
I.5.2. Glicerolformal.....	26
I.5.2.1. Características del glicerolformal.....	26
I.5.2.2. Usos del glicerolformal.....	27
I.5.3. Propilén glicol.....	27
I.5.3.1. Características del propilén glicol.....	27
I.5.3.2. Usos del propilén glicol.....	27
I.6. CARACTERÍSTICAS DEL CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).....	28
I.6.1. Flujo del cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	28
I.6.2. Validación del método analítico.....	29
I.7. JUSTIFICACIÓN.....	31
I.8. OBJETIVO GENERAL.....	31
I.9. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	32
I.10. Meta.....	32
I.11. REFERENCIAS.....	32
II. EXPERIMENTO 1. SOLUBILIDAD DEL COMPUESTO ALFA CON CICLODEXTRINAS, GLICEROLFORMAL Y PROPILÉNGLICOL.....	42

II.1. Resumen.....	42
II.2. Introducción.....	43
II.3. Material y métodos.....	44
II.4. Resultados.....	45
II.5. Discusión.....	46
II.6. Conclusión.....	47
II.7. Referencias.....	47
III. EXPERIMENTO 2. EFICACIA <i>IN VITRO</i> DEL COMPUESTO ALFA SOLUBILIZADO CONTRA FASCIOLAS INMADURAS.....	55
III.1. Resumen.....	55
III.2. Introducción.....	56
III.3. Material y métodos.....	56
III.4. Resultados.....	58
III.5. Discusión.....	58
III.6. Conclusión.....	58
III.7. Referencias.....	58
IV. EXPERIMENTO 3. CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL.....	61
IV.1. Resumen.....	61
IV.2. Introducción.....	61
IV.3. Material y métodos.....	63
IV.4. Resultados.....	65
IV.5. Discusión.....	66
IV.6. Conclusión.....	67
IV.7. Referencias.....	67
V. EXPERIMENTO 4. EFICACIA Y CINÉTICA DEL COMPUESTO ALFA SOLUBILIZADO EN CONEJOS INFECTADOS ARTIFICIALMENTE CON <i>Fasciola hepatica</i>	71
V.1. Resumen.....	71
V.2. Introducción.....	72
V.3. Material y métodos.....	72
V.4. Resultados.....	75
V.5. Discusión.....	76

V.6. Conclusión.....	78
V.7. Referencias.....	78
VI. EXPERIMENTO 5. EFICACIA Y CINÉTICA DEL COMPUESTO ALFA SOLUBILIZADO EN OVINOS INFECTADOS ARTIFICIALMENTE CON <i>Fasciola hepatica</i>	83
VI.1. Resumen.....	83
VI.2. Introducción.....	84
VI.3. Material y métodos.....	84
VI.4. Resultados.....	87
VI.5. Discusión.....	88
VI.6. Conclusión.....	90
VI.7. Referencias.....	90
VII. CONCLUSIONES GENERALES.....	95
VIII. ARTÍCULOS PUBLICADOS Y EN PROCESO.....	96
CUADROS	
Cuadro 1. Porcentaje de solubilidad del compuesto Alfa utilizando diferentes vehículos determinado por medio del CLAR	50
Cuadro 2. Eficacia fasciolicida <i>in vitro</i> del compuesto Alfa solubilizado con diferentes vehículos.....	60
Cuadro 3. Histopatología de músculo esquelético de ratones inyectado con el compuesto Alfa solubilizado.....	70
Cuadro 4. Eficacia fasciolicida del compuesto Alfa administrado en formulación inyectable en conejos.....	81
Cuadro 5. Eficacia fasciolicida del compuesto Alfa administrado en formulación inyectable en ovinos.....	94
FIGURAS	
Figura 1. Determinación de la presencia del compuesto Alfa y alfa ciclodextrina por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	51
Figura 2. Determinación de la presencia del compuesto Alfa y beta ciclodextrina por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	51
Figura 3. Determinación de la presencia del compuesto Alfa e hidroxipropil alfa ciclodextrina por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	52
Figura 4. Determinación de la presencia del compuesto Alfa e hidroxipropil beta ciclodextrina por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución	52
Figura 5. Determinación de la presencia de los estándares del compuesto Alfa por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	53
Figura 6. Detección del compuesto Alfa solubilizado con HP β CD por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	53
Figura 7. Detección del compuesto Alfa solubilizado con propilenglicol por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	54
Figura 8. Detección del compuesto Alfa solubilizado con glicerolformal por medio del	54

cromatógrafo de líquidos de alta resolución.....	
Figura 9. Estándares del compuesto Alfa y sus metabolitos sulfóxido y sulfona en suero control y tratamiento de conejos, medido por el cromatógrafo de líquidos de alta resolución	82
Figura 10. Estándares del compuesto Alfa y sus metabolitos sulfóxido y sulfona en sueros control y tratamientos en ovinos, medido por el cromatógrafo de líquidos de alta resolución....	95

RESUMEN

EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DE FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL SOLUBILIZADO CON CICLODEXTRINAS

Javier Arturo Munguía Xóchihua

El objetivo general fue el de solubilizar el compuesto Alfa o 5-cloro-2-metil-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol para obtener una formulación inyectable. Para ello se realizaron 5 experimentos los cuales tuvieron como objetivos específicos: 1. Solubilizar el compuesto Alfa, por medio de la formación de aductos con cuatro ciclodextrinas y el uso de la cosolvencia con propilenglicol y glicerolformal, se determinó la solubilidad mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). 2. Determinar la eficacia *in vitro* contra *Fasciola hepatica* inmadura. 3. Evaluar si existe daño tisular postratamiento en ratones tratados con el compuesto por vía intramuscular. 4 y 5. Determinar la eficacia fasciolicida y la cinética del compuesto Alfa, en conejos y ovinos infectados artificialmente con metacercarias de *Fasciola hepatica*. Resultados. Se solubilizó al compuesto Alfa en un 100 %, con una eficacia *in vitro* del 100 % contra fasciolas inmaduras. Los estudios histopatológicos indicaron que no hubo daño en músculo de los ratones inyectados con el compuesto. Las pruebas de eficacia fasciolicida mostraron una actividad insuficiente en conejos de 16.67 % y 68.4 %; en ovinos de 56.46 % y 73.95 %, por medio de la cromatografía de líquidos de alta resolución no se encontró la presencia del compuesto y sus metabolitos sulfóxido y sulfona en suero. Se concluye que se logró solubilizar al compuesto Alfa, obteniendo eficacia fasciolicida *in vitro* de 100 %, los estudios histopatológicos realizados a ratones inyectados con el compuesto, no mostraron daños en el huésped, sin embargo, el compuesto Alfa inyectado en conejos y ovinos mostró una eficacia contra *F. hepatica* deficiente. Los análisis cromatográficos llevados a cabo en muestras de conejo y ovino, no detectaron concentraciones plasmáticas del compuesto.

ABSTRACT

IN VITRO AND IN VIVO EVALUATION OF AN EXPERIMENTAL FASCIOLICIDE SOLUBILIZED WITH CYCLODEXTRINS

Javier Arturo Munguía Xóchihua

The aim of the present study was to evaluate a solubilization approach compound Alpha ($C\alpha$) in order to obtain an injectable formulation. Hence, 5 experiments were carried out to: 1) Solubilize $C\alpha$ through adduct formation with four cyclodextrins and the use of cosolvency with propylene glycol and glycerol formal and test solubility by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). 2) Determine the in vitro efficacy against juvenile *Fasciola hepatica*. 3) Evaluate tissue damage after intramuscular treatment in a murine model. 4 and 5) Determine the fasciolicide efficacy and kinetics of $C\alpha$ in experimentally-infected rabbits and sheep. RESULTS: $C\alpha$ was 100% solubilized with a 100% in vitro efficacy against immature liver flukes. Histopathology studies showed that there was no damage in mice muscles after $C\alpha$ injection. Nevertheless, results showed a low fasciolicide efficacy on rabbits (16.67 and 68.4%) and sheep (56.46% and 73.95%). Using HPLC, no compound or its metabolites, namely sulphoxide and sulphone were detected in serum. It is therefore concluded that $C\alpha$ was solubilized achieving an in vitro efficacy of 100%. Furthermore, no injuries were observed in histopathological studies in mice injected with the compound. Nonetheless, when $C\alpha$ was administered to rabbits and sheep, a low fasciolicide efficacy was observed. HPLC analysis of rabbit and sheep samples did not detect plasmatic concentrations of $C\alpha$.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. *Fasciola hepatica*

Una de las enfermedades parasitarias que más se ha estudiado a nivel mundial es la Fasciolosis (Kassai *et al.*, 1988; Mas-coma *et al.*, 2001; Dreyfuss *et al.*, 2002), la cual se debe a la presencia y acción de *Fasciola hepatica* en el parénquima hepático y conductos biliares de ovinos, bovinos, caprinos, cerdos, equinos, conejos, venados, hombre y otros animales domésticos y salvajes (Dunn, 1982; Over, 1982; Quiroz, 1984; Soulsby, 1987).

La fasciolosis tiene una gran capacidad de propagación, en relación con la ampliación de nichos ecológicos de los huéspedes intermediarios, y la facilidad de colonización y adaptación del parásito que permiten tasas más elevadas de transmisión del parásito (Mas-Coma, 1999).

La enfermedad está presente en la República Mexicana, sin embargo, su frecuencia varía de una región a otra, debido principalmente a la presencia de caracoles de la familia Lymnaeidae como *F. humilis*, *F. bulimoides*, *F. viatrix* que son los huéspedes intermediarios (Cruz *et al.*, 2002). En México se ha diagnosticado en 29 estados en donde las prevalencias van del 2 % hasta el 100 % (Quiroz, 1984).

I.1.1. Morfología

El parásito adulto mide de 18 a 50 por 4 a 14 mm; el cuerpo es aplanado dorsoventralmente de forma foliácea, ancha anteriormente formando un cono posterior. Su cuerpo está cubierto por pequeñas espinas; posee una ventosa oral en el extremo superior, otra, la ventral a la altura de los “hombros”; el esófago se bifurca a poca distancia de la ventosa oral, formando ramas primarias y secundarias que se extienden hasta la parte posterior del cuerpo. El parásito es hermafrodita, debajo de la ventosa ventral se abre el poro genital.

Los huevos miden de 130 a 150 por 63 a 90 micras (μm), poseen un opérculo; su cáscara es relativamente delgada, está teñida por pigmentos biliares de tonos amarillos en su interior, donde entre numerosas células vitelinas yace el cigoto de color claro y posición central. (Dunn, 1982; Quiroz, 1984; Soulsby, 1987).

I.1.2. Ciclo biológico

En los años de 1882 y 1883 en forma independiente, Thomas en Inglaterra y Leuckart en Alemania completan el estudio del ciclo de vida del trematodo (Reinhard, 1967). Es conocido como pirihuin en Chile, saguipé en el sur de Argentina y orejuela, palomilla o duela del hígado en México.

El descubrimiento del ciclo evolutivo de *F. hepatica* marcó el inicio de los estudios experimentales sistematizados en parasitología animal.

El ciclo inicia con la fertilización de los **huevos**, que caen en la vesícula biliar del huésped definitivo para después salir con las heces; los huevos se desarrollan en un medio hídrico y forman miracidios. El tiempo de formación del miracidio y eclosión por el opérculo es de 12 días a 26° C (Georgi y Marion, 1990).

El **miracidio** mide 150 por 40 µm, posee una mancha ocular en forma de X con acción fototrópica pasiva, glándulas y espolón cefálico, éste se dirige hacia la superficie del agua; nada activamente de un lado a otro hasta que llega a un caracol susceptible del género y especie *Limnaea cubensis*, *L. columella*, *L. obrusa* *F. humilis*, *F. bulimoides*, *F. viatrix* (Georgi y Marion, 1990; Cruz *et al.*, 2002), en cuya cavidad respiratoria o, a través del tegumento del pie penetra con ayuda de un botón cefálico, localizándose generalmente en las glándulas digestivas (hepatopáncreas) (Georgi y Marion, 1990).

El **miracidio** que penetra en el caracol pierde su cubierta de cilios, se vuelve esférico, y se transforma en **esporoquiste** que mide 500 µm de longitud; a partir de la pared de éste se forman de 5 a 10 masas germinativas que se convierten en **redias**, éstas forzan la pared del esporoquiste y continúan creciendo en las glándulas intestinales del caracol; en su pared corporal las redias forman más de 50 masas germinativas, que dan lugar a las **cercarias**. Después de 6 a 8 semanas las cercarias abandonan a las redias a través de su abertura tocológica y al caracol por su aparato respiratorio (Georgi y Marion, 1990).

La evolución cuantitativa y cualitativa de la descendencia de *Fasciola* en la formación de redias, está relacionado con el estado de nutrición y edad del caracol, en buenas condiciones puede dar origen a una segunda generación de redias. Un miracidio llega a producir hasta 600 cercarias (Quiroz, 1984; Georgi y Marion, 1990).

Las **cercarias** liberadas miden de 260 a 320 por 200 a 240 μm , sin considerar la cola propulsora que mide 500 μm de longitud; éstas nadan activamente de un lado a otro y después de poco tiempo, redondea su cuerpo llamándose **metacercarias**, la cual se adhiere a la superficie de plantas u objetos que se encuentran en los lugares donde habita (Soulsby, 1987).

La infección del huésped definitivo se realiza por medio de la ingestión de alimentos como forraje verde y agua contaminados con metacercarias. En el intestino se disuelve la membrana quística externa y queda libre el trematodo joven que mide 250 μm ; éste penetra activamente a través de la pared del intestino, alcanzando la cavidad peritoneal en aproximadamente tres horas después, permanece ahí de tres a quince días; después avanzando por el peritoneo llega a la cápsula de Glisson la cual penetra, y de 4 a 6 días después llega al tejido hepático donde dura de 6 a 8 semanas, para finalmente asentarse en un conducto biliar. Una vez que los huevos son producidos por la fasciola adulta éstos son llevados por la bilis al intestino y desde allí al exterior por las heces del huésped para iniciar un nuevo ciclo evolutivo.

El **período prepatente** es de 9 a 12 semanas. La vida del parásito en los conductos biliares de bovinos es más o menos de un año y en ovinos hasta de 11 años (Quiroz, 1984; Soulsby, 1987; Georgi y Marion, 1990).

I.1.3. Patogenia

La patogenicidad de *Fasciola hepatica* depende del número de metacercarias ingeridas, su viabilidad y si es primera o segunda infección, así como el tipo de huésped y su edad.

La enfermedad se puede presentar en forma crónica y aguda. En donde la forma crónica pocas veces llega a causar la muerte del huésped y se debe a la presencia de los trematodos adultos en los conductos biliares; el hígado presenta puntos de abscesos, fibrosis y colangitis hiperplásica, en el caso de los bovinos se puede presentar calcificación de los conductos biliares (calcifilaxis). La presentación aguda es más común en los ovinos, es ocasionada por el tránsito sin rumbo de las fasciolas inmaduras por el hígado. La lesión característica es una hepatitis traumática (Dunn, 1982).

La presencia de este parásito a nivel hepático y en sus estructuras da como consecuencia inflamación peritoneal, edema de epiplón mayor y adherencias laxas al diafragma y a los órganos vecinos. La cápsula de Glisson presenta engrosamiento e infiltración leucocitaria denominadas “microabscesos” de color blanquecino y de aproximadamente 2 mm. Se presentan focos necróticos que se originan en el período de invasión por parte del parásito, además con la presencia de zonas de esclerosis. Por lo cual los conductos biliares interlobulares que están alrededor de estos focos aparecen dilatados y esclerosados.

La hiperplasia de los conductos biliares no sólo es provocada por el contacto físico del parásito sino también por medio de inducción química. Una es debida a la secreción de prolina, un aminoácido que interviene en la síntesis de colágeno en el parásito. La otra es que durante la migración del parásito en el huésped se va secretando cisteinas proteasas que favorecen también el daño a nivel del tejido hepático (Alcalá *et al.*, 2005).

Los signos clínicos en la presentación aguda son casi inaparentes, en huéspedes muy afectados se puede observar depresión, anorexia, aislamiento, fatiga y ascitis. En la forma crónica se manifiesta la anemia, edema submandibular y en casos extremos ocasiona la muerte (Quiroz, 1984; Soulsby, 1987; Georgi y Marion, 1990).

Se notifica que en la oveja, la rata y el conejo, la reacción tisular, aunque sea severa, no logra aislar a los parásitos y éstos pueden completar con facilidad su ciclo biológico, por lo cual son especies susceptibles al parásito; en el vacuno y en el hombre a reacción fibrótica logra aislar y matar distomas jóvenes en la etapa de invasión (invasión y migración de fasciolas jóvenes al parénquima hepático) y a los adultos localizados en las vías biliares; en el hámster, el cerdo y los carnívoros, esta reacción es aún más eficiente porque detiene, aísla y mata tanto los helmintos jóvenes que migran, como a los adultos. La inmunidad adquirida es de tipo humoral (con anticuerpos precipitantes, aglutinantes y fijadores de complemento) y de tipo celular (Ramírez, 2007).

I.1.4. Epidemiología de fasciolosis en México

La enfermedad está presente en rumiantes domésticos de 29 Estados de la República Mexicana y tiene su mayor prevalencia en zonas tropicales y templadas (Quiroz, 1986). Se considera que las prevalencias de fasciolosis observadas difieren por la falta de investigaciones en muchas regiones del país, se cree que éste parásito tiene una mayor distribución y en algunos lugares aumenta la prevalencia, debido a los constantes cambios en los sistemas de producción pecuarios y agrícolas de México, que favorecen el desarrollo de *F. hepatica*.

La enfermedad se presenta en casi toda la República Mexicana, sin embargo, su frecuencia varía de una región a otra, debido principalmente a la presencia de caracoles de los géneros *Limnaea*, *Fossaria* y *Galba* que son los huéspedes intermediarios (Quiroz, 1984; Cruz *et al.*, 2002).

La prevalencia de fasciolosis es variable y depende de hábitats primarios o secundarios de caracoles, en el primer caso la infección puede ocurrir durante todo el año, como la zona costera del Golfo de México, y en el segundo caso posiblemente se limite en las zonas endémicas del altiplano en donde la temperatura es superior a 10° C (Quiroz, 1996). Una situación similar a las zonas secundarias de caracoles puede suceder en las áreas de riego de México que favorecen los factores que permiten el desarrollo del ciclo biológico de *F. hepatica*.

La presencia y prevalencia de fasciolosis en México es variable, en los Estados que se presenta con más del 10 % son Tabasco y Veracruz; del 1 al 10 % son el Edo. de México, Oaxaca y Chiapas y con menos del 1 % están Guanajuato, Michoacán, San Luis Potosí, Querétaro, Chihuahua, Zacatecas y Sonora (Quiroz, 1986; Quiroz y Castellanos, 1991). Actualmente se considera que en todo el país existen informes de *F. hepatica* con diversas prevalencias; excepto en Coahuila, la península de Yucatán y Baja California Sur debido a sus características climatológicas y tipo de suelo calcáreo (Rangel y Martínez, 1994).

I.1.5. Impacto económico de la fasciolosis

Una de las enfermedades parasitarias que más se ha estudiado a nivel mundial es la fasciolosis (Kassai *et al.*, 1988). La forma de presentación es aguda y crónica, ocasiona mortalidad y disminución de la producción como mala calidad de la leche, deficiente conversión alimenticia que causa disminución del crecimiento, pérdida de peso, baja fertilidad y decomiso de hígados en forma parcial o total en los rastros o mataderos, que producen considerables pérdidas económicas en rumiantes (Castellanos *et al.*, 1992; Rangel y Martínez, 1994), que pueden ser directas (mortalidad) e indirectas (baja producción de leche y carne), siendo la última la que mayor daño ocasiona a la producción pecuaria del país (Encinas *et al.*, 1989; Pfister, 1990; Bossaert *et al.*, 1999).

Las pérdidas que ocasiona *F. hepatica* se clasifican como directas cuando mueren animales jóvenes por infecciones masivas de metacercarias e indirectas por ocasionar baja producción y mala calidad de la leche, deficiente conversión alimenticia que causa disminución del crecimiento, baja fertilidad y decomiso de hígados en forma parcial o total en los rastros o mataderos (Encinas *et al.*, 1989; Castellanos *et al.*, 1992; Rangel y Martínez, 1994).

Los efectos que *F. hepatica* ocasiona en los índices de fertilidad en ganado vacuno infectado por fasciolas o no tratado de forma adecuada, muestran que después de un tratamiento fasciolicida el porcentaje de hembras gestantes en la primera inseminación artificial aumenta del 38 % hasta el 66 % (Marín *et al.*, 1993). Así como se estima que la fasciolosis ocasiona 0.5 servicios extras por concepción y aumenta el intervalo entre partos en 20 días. Por lo cual se elevan los costos de alimentación, con bajas ganancias de peso, lo cual disminuye las ganancias de las empresas pecuarias.

La fasciolosis en bovinos causa una disminución productiva de 8 % en infecciones leves y más de 20 % en los casos graves (Quiroz, 1986). Situaciones que la mayor parte de las veces pasan inadvertidas por el ganadero (Encinas *et al.*, 1989).

Las pérdidas económicas por decomiso de vísceras como hígado, corazón y riñón, alcanzan valores importantes aun en los países desarrollados, en Estados Unidos la segunda causa de decomisos de hígados es *F. hepatica* (Montgomery, 1992), en general el decomiso de

hígados por el trematodo varía entre un 10 y 20 % de los animales llevados al rastro (Moukrim *et al.*, 1992; Wacker *et al.*, 1999) elevándose entre un 45 y 55 % en los países subdesarrollados (Rangel *et al.*, 1999; Wauriuri *et al.*, 2000).

Datos estimados en México muestran que de 36 millones de bovinos, 18 millones están expuestos a la infección por *Fasciola*, debido a que el ganado se encuentra localizado en zonas endémicas al trematodo. Sin embargo, estudios epidemiológicos muestran que alrededor de 5 millones están realmente infectados; se estima que cada animal pierde en su vida productiva 30 kg de carne a un costo de \$30.00 por kilo, se obtiene una pérdida global aproximada de \$ 4,500,000,000.00 (Ibarra *et al.*, 2000a).

I.2. ANTECEDENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS

I.2.1. Quimioterapia contra *Fasciola hepatica*

Los trematodocidas pertenecen a diversos grupos de acuerdo a su estructura y modo de acción. Tienen actividad variable contra el estado parasítico de los trematodos y marcadas diferencias en toxicidad. El comprender estas características es importante para el uso seguro y adecuado de estos compuestos (McKellar y Kinabo, 1991).

Los fasciolocidas actuales se ubican en cinco grupos químicos:

1. Fenoles halogenados: Bitionol (Bitin, Actamer), Hexaclorofeno (antiguamente Bilevón), Niclofolán (Bilevón) y Nitroxinil (Trodax).
2. Salicilanidas: Brotianide (Dirian), Closantel (Flukiver), Seponver, (Supaverm, Cosicare),
3. Oxiclozanida (Nilzan, Zani), Rafoxanide (Flukanide; Ranizol; Ranide).
4. Bencimidazoles: Albendazol (Valbazen), Mebendazol (Telmin, Vermox, Supaverm), Triclabendazol (Fasinex), Luxabendazol (Fluxacur).
5. Sulfonamidas: Clorsulón (Curatrem, Ivomec F, Ivomec Plus).
6. Fenoxialcanos: Diamfenetide (Coriban).
(Fairweather y Boray, 1999).

I.2.2. Antihelmínticos bencimidazoles

Los bencimidazoles son un grupo de desparasitantes de amplio espectro y ampliamente conocidos, los cuales tienen a nivel mundial un mercado de aproximadamente 300 millones de dólares anuales (Delatour y Parish, 1986).

Estos compuestos presentan un mecanismo de acción similar como: inhibición de la polimerización de la tubulina, inhibición de la captación de la glucosa, inhibición de la fumarato reductasa (Sumano y Ocampo, 2006). La discrepancia en cuanto a la eficacia de estos fármacos contra los distintos parásitos se debe probablemente a la diferencia en la biodisponibilidad de los mismos dentro del animal hospedero; siendo los más potentes aquellos que presentan las velocidades de absorción más rápidas y eliminación más lentas.

Los más utilizados a nivel mundial son albendazol, netobimin (probencimidazol), albendazol sulfóxido y triclabendazol, siendo este último el que ha mostrado mayor eficacia contra todos los estadios evolutivos de *Fasciola hepatica*, aún cuando algunos autores al evaluar este compuesto señalan que no reduce la carga parasitaria en un 100 % (Boray, 1994; Dorchies y Lahitte, 1983).

El mejor método de control es mediante el uso de agentes quimioterapéuticos, entre los que destacan el triclabendazol como fármaco de elección y como productos alternativos el closantel, nitroxinil y clorsulon.

El triclabendazol es un producto eficaz contra la mayoría de los estadios evolutivos de *Fasciola hepatica*, pero su eficacia ha disminuido en los últimos años en virtud de ser asociado a resistencia al fármaco (Fairweather y Boray, 1999).

El triclabendazol salió a la venta en 1983, desde entonces no se ha registrado un nuevo fasciolicida. Lo cual determina una necesidad de contar con fármacos alternativos de igual o mayor eficacia al triclabendazol, para controlar esta parasitosis.

I.3. EL COMPUESTO ALFA

I.3.1. Antecedentes del compuesto Alfa

En México se han utilizado por lo menos 21 compuestos fasciolicidas en las últimas décadas, en la actualidad se encuentran aproximadamente ocho compuestos en el mercado, los cuales en su mayoría tienen bajos índices de seguridad (Ibarra, 1991). Sin embargo, la fasciolosis no ha disminuido por lo que se manifiesta la necesidad de producir un compuesto fasciolicida que sea eficaz contra todos los estadios evolutivos de *F. hepatica*, y pueda competir en el aspecto económico con los productos de importación como el triclabendazol, considerado como el mejor químico a nivel mundial.

En el Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (CENID-PAVET del INIFAP), se ha estado realizando el escrutinio *in vitro* e *in vivo* de compuestos de síntesis química. Dichos compuestos fueron sintetizados en colaboración con profesores e investigadores del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con la finalidad de contar con una alternativa nacional para el tratamiento de la fasciolosis.

Como parte de un programa de síntesis de nuevos compuestos antihelmínticos y con el fin de obtener una mayor información acerca de los requerimientos estructurales para la actividad antihelmíntica, se sintetizó una serie de compuestos análogos al triclabendazol, entre ellos el 5-cloro-2-metil-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol llamado compuesto Alfa (CP α) (Hernández *et al.*, 2002).

I.3.2. Síntesis del compuesto Alfa

Para la síntesis se utilizó un modelo pronetalol el cual es un bloqueador adrenérgico formado por reemplazo de grupo 3,4-diclorofenil en dicloroisoproterenol (DCI) por el grupo 2 naftil. El DCI es también un bloqueador adrenérgico con una actividad agonista, por lo cual el pronetalol es un bioisostero del DCI.

El 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-Bencimidazol se obtuvo como un análogo del triclabendazol. En este compuesto el grupo 1-naftil reemplazó al grupo 3,4-diclorofenil en el TCB, cambio análogo hecho con pronetalol-DCI.

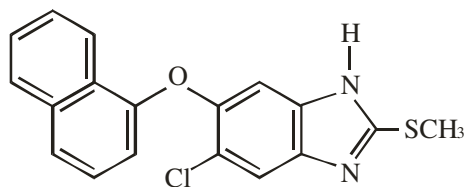
La preparación de la secuencia de la síntesis se describe en seis pasos: En un primer (1) paso se substituyó la 4,5-dicloro-2-nitroanilina a una reacción de sustitución nucleofílica con el 1-naftol, (2) bajo condiciones ya conocidas el éter obtenido, (3) fue reducido con $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. La correspondiente o-fenilendiamina, (4) formada es ciclocondensada con CS_2 en una solución de EtOH-KOH que lleva al 2-mercaptobencimidazol, (5) el último paso, este fue monoalquilado con CH_3I en acetona con solución de KOH para alcanzar el título del compuesto (Hernández *et al.*, 2002).

El compuesto sintetizado fue purificado por recristalización determinando sus constantes físicas, la estructura del compuesto fue establecida por espectroscopía y datos espectrométricos (Hernández *et al.*, 2002).

I.3.3. Información técnica

Las características de compuesto Alfa son: es un polvo blanco cristalino con ligero olor característico a azufre, con un peso molecular de 340.86. Su punto de fusión es de 171 – 179° C, presenta un Pka de 2.879, muestra características de ácido débil. Su coeficiente de partición aparente en octanol/agua es 27.63 ($\log P = 1.44$)⁹ y su fórmula condensada es $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{OS}$.

Formula desarrollada:



5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol

I.3.4 Propiedades químicas del compuesto Alfa

I.3.4.1. Estudios toxicológicos

Con la finalidad de conocer la posible toxicidad del CP α en vacas con 1, 3, 6 y 9 meses de gestación, se realizó un experimento para determinar los efectos adversos debidos a la administración de este compuesto. Los resultados mostraron que no hubo efectos adversos en las vacas tratadas, así como en las crías. Se concluye que el CP α administrado a 12 mg/kg por vía oral, no induce alteración alguna en las vacas (Ayala, 2003).

I.3.5. Mecanismo de acción

Con la finalidad de determinar mediante microscopía electrónica de barrido los cambios estructurales en el tegumento de fasciolas adultas después del tratamiento con el CP α *in vivo* (12 mg/kg *per os*) y su metabolito sulfóxido *in vitro* (40 mg/L). Los resultados indicaron que el CP α ejerce un efecto importante sobre el tegumento de *Fasciola hepatica* (Rivera *et al.*, 2004).

Posteriormente se realizó un estudio morfológico del tegumento de fasciolas resistentes a triclabendazol, para determinar los efectos del CP α *in vivo* (10 mg/kg) a 24 y 48 h y su metabolito sulfóxido (10 ug/ml) por 24 horas. Los cambios morfológicos del tegumento interno y de la superficie se examinaron por medio de microscopía electrónica de barrido y de transmisión, se demostró un rompimiento del tegumento de las fasciolas después de 24 horas del tratamiento *in vitro*, se obtuvo una alta actividad fasciolicida del CP α contra un aislado resistente a triclabendazol, asimismo se señala al compuesto Alfa como una posible estrategia potencial para atacar los problemas actuales de resistencia a antihelmínticos (Mc Conville, 2004).

Para observar los daños que el CP α ocasiona en el tegumento de *Fasciola hepatica* de 3 semanas de edad a diferentes horas después del tratamiento, se utilizó microscopía electrónica de barrido observándose a las 6 horas lesiones en la superficie ventral y región anterior; a las 12 horas cambios estructurales y pérdida de las espinas en la región anterior ventral; a las 24 horas se perdió completamente la superficie en algunas áreas exponiendo la lámina basal (Rivera *et al.*, 2005)

I.3.6. Determinación de dosis máxima tolerada e índice de seguridad del compuesto

Alfa en bovinos

Se evaluó la dosis máxima tolerada (DMT) y el índice de seguridad (IS) del compuesto Alfa en bovinos. Se utilizaron 18 bovinos divididos en 6 grupos de tres animales cada uno para recibir las dosis de 12, 36, 60, 120 y 180 mg/kg/po, respectivamente. El grupo 6 sirvió como testigo sin tratamiento. Los animales también fueron monitoreados en sus parámetros bioquímicos, hematológicos y constantes fisiológicas mostrándose clínicamente sanos durante el experimento. Los resultados indicaron que la DMT para el CP α es de 180 mg/kg/po correspondiendo a un IS de 15 veces la dosis clínica recomendada, lo cual muestra una amplia seguridad del fármaco (Vera *et al.*, 2006).

I.3.7. Excreción de residuos del compuesto Alfa en leche

Con el objetivo de determinar la cinética del CP α en leche, se utilizaron 14 vacas Holstein Friesian en producción. En la hora cero, los animales se trataron con el CP α a una dosis única de 12 mg/kg/vía oral y seguidamente se tomaron muestras de leche aproximadamente 250 ml por bovino a las 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 48, 64, 72, 128, 256, 512 y 1024 horas. Las muestras se mantuvieron a -70° C para su posterior análisis. Para este fin, se utilizó cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) y se determinaron las constantes de eliminación de los valores de cinética de primer orden del CP α en la leche de los bovinos. Los resultados indicaron que aún cuando la sensibilidad es la adecuada (12 mg/ml), los niveles del CP α y su metabolito sulfóxido no fueron detectables en los tiempos de muestreo analizados, indicando que el fármaco es eliminado en la leche a concentraciones menores que las señaladas en este estudio (Vera *et al.*, datos no publicados).

I.3.8. Eficacia del compuesto Alfa contra fasciolas de 4 y 10 semanas

Se evaluó la eficacia fasciolicida del CP α contra Fasciolas de 4 y 10 semanas de edad utilizando 15 novillos divididos en 3 grupos de 5 animales cada uno e infectados experimentalmente con metacercarias del parásito. En el día 75, los grupos 1 y 2 fueron tratados con CP α y triclabendazol a una dosis única de 12 mg/kg vía oral. El grupo 3 fue

testigo sin tratamiento. A los 45 días postratamiento: los resultados indicaron un 100 % y un 99.4 % de reducción respectivamente. No se observaron diferencias estadísticas con respecto a la eficacia de ambos antihelmínticos, concluyen que el CP α mostró alta eficacia contra fasciolas de 4 y 10 semanas de edad (Vera *et al.*, 2001).

I.3.9. Determinación de la dosis efectiva en bovinos

Se determinó la dosis efectiva del CP α en bovinos infectados en forma natural y experimental evaluando las dosis de 10, 12 y 14 mg/kg/per os; respectivamente. Los resultados en el primer estudio mostraron un porcentaje de reducción de fasciolas de 94.3, 100 y 100 y en el segundo estudio, 84.2, 99.6 y 100 para los grupos 1 al 3 respectivamente, se concluyó que la dosis efectiva seleccionada para el CP α fue de 12 mg/kg/po, en ganado que tenía una infección inducida o natural por *Fasciola hepatica* (Ibarra *et al.*, 2004).

I.3.10. Estudios de farmacocinética

I.3.10.1. Ovinos. Se desarrolló un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución para determinar del CP α y su metabolito sulfóxido en plasma y orina de ovinos (Del Rivero *et al.*, 1998). Una vez validado el método, se administró el CP α a dosis de 12 mg/kg por vía oral a 7 ovinos de raza pelibuey. Se observó que el compuesto Alfa sufre efecto de primer paso metabolizándose a sulfóxido, con una vida media de absorción de 6.17 horas, vida media de eliminación de 18.95 horas, concentración plasmática máxima de 8.0 μ g/ml, tiempo para llegar a la concentración plasmática máxima de 11.4 horas, una área bajo la curva de 238.39 μ g h/ml, un volumen de distribución de 59.57 L y una depuración de 68.76 ml/min (Del Rivero *et al.*, 1998).

I.3.10.2. Bovinos. Se evaluaron los parámetros farmacocinéticos administrando a 7 bovinos criollos una dosis oral de 12 mg/kg de peso, tomando muestras plasmáticas de la vena yugular a intervalos de tiempos estandarizados.

La farmacocinética de los metabolitos sulfóxido y sulfona se describió de acuerdo a un modelo abierto de un compartimiento (MAUC) las vidas medias de aparición obtenidas 6 para el sulfóxido y para la sulfona fueron de 9.43 ± 5.10 horas y 26.26 ± 2.73 horas,

respectivamente. La vida media de eliminación del sulfóxido se calculó en 25.82 ± 2.35 horas y para la sulfona de 34.79 ± 8.36 horas.

El tiempo medio de residencia (TMR) del sulfóxido fue de 56.45 ± 2.40 horas y de la sulfona fue de 91.54 ± 10.57 horas lo cual indica que estos metabolitos están presentes en el organismo por un tiempo prolongado (Vértiz, 2000).

I.3.11. Estudios quimioterapéuticos

I.3.11.1. Ovinos. Se observó que en los estudios previamente realizados, la variabilidad de eficacia del CP α podría atribuirse, en parte, a que éste se administró en una suspensión de dimetilsulfóxido al 5 % en agua, la cual no siempre producía resultados consistentes.

Considerando el problema anterior, se realizó otro estudio en borregos con la finalidad de seleccionar un vehículo idóneo para formular el CP α . Para ello se utilizaron 25 ovinos infectados artificialmente con 200 metacercarias del parásito y se dividieron en 5 grupos de 5 animales cada uno. Los grupos 1 al 4 se trataron con el CP α a una dosis de 15 mg/kg formulado en diferentes vehículos, el grupo 5 quedó como testigo sin tratamiento. Los resultados mostraron una eficacia de 100 % para los grupos 1 y 2, de 92.4 % en el grupo 3 y de 77 % para el grupo 4, para fasciolas adultas de 10 semanas y de 100 % contra fasciolas juveniles de 4 semanas de edad, mostrando con esto una mejoría muy aceptable en la formulación del fármaco (Ibarra *et al.*, 2000b).

En otro estudio, se utilizaron 60 ovinos de raza pelibuey libres de infección por *F. hepatica*, para evaluar la eficacia del CP α contra fasciolas de 3 días, 2, 4, 6, 8 y 10 semanas de edad. En el día 0 todos los animales fueron infectados por vía oral con 150 metacercarias, se formaron 12 grupos de 5 animales cada uno. Los grupos 1, 3, 5, 7, 9 y 11 se trataron con el compuesto Alfa a una dosis de 12 mg/kg vía oral a los 3 días, 2, 4, 6, 8 y 10 semanas después de la infección respectivamente. Los grupos 2, 4, 6, 8, 10 y 12 fueron testigo sin tratamiento. Los animales se sacrificaron 4 semanas posteriores al tratamiento, colectando el hígado para el conteo de fasciolas presentes en éste. La eficacia se midió con base en el número de trematodos presentes en los grupos tratados con respecto al número de parásitos del grupo testigo. Los resultados mostraron una eficacia del 100 % en todos los grupos tratados. Los grupos testigo tuvieron un promedio de 189 fasciolas a la necropsia. Se

concluye que el CP α mostró una eficacia altamente aceptable contra fasciolas de diversas edades en ovinos (Rivera *et al.*, 2002).

I.3.11.2. Bovinos. Con las experiencias alentadoras obtenidas con el CP α en ovinos, se procedió a realizar un estudio en bovinos infectados en forma natural, el cual consistió en determinar el porcentaje de reducción de huevos del parásito a los 14 días postratamiento. Se utilizaron 40 vaquillas divididas en grupos de 10 animales cada una.

Los grupos 1 al 3 fueron tratados con el CP α a dosis de 15 mg/kg, con el triclabendazol a 12 mg/kg (Fasinex-Ciba Geigy) y con Closantel a 5 mg/kg (Flukiver-Roussel) respectivamente. El grupo 4 fue testigo sin tratamiento. Los porcentajes de eficacia obtenidos fueron de 90.1 %, 91.5 % y 82.1 %, para los tres compuestos respectivamente (Ibarra *et al.*, 2002).

I.4. Generalidades en la formulación de nuevos compuestos

Una suspensión es un sistema heterogéneo que consiste en dos fases, una es continua o externa, que es generalmente un líquido o un semisólido y la otra es dispersa o interna, que es insoluble en la primera (Rowe *et al.*, 2006).

Una suspensión (solución) es una forma farmacéutica, en la cual existe uno o mas fármacos (fase dispersa) en una acuosa (fase dispersante) donde estos no son solubles (Rowe *et al.*, 2006).

Las suspensiones pueden ser la opción para resolver el problema de la administración de fármacos poco solubles, estas deben ser lo suficientemente viscosas para mantener las partículas del fármaco separadas unas de otras, pero también lo suficientemente fluidas para permitir su fácil administración. La viscosidad requerida en la suspensión, depende de la tendencia del principio activo a sedimentar (formación de torta), que a su vez depende del tamaño de la partícula y de la densidad del polvo (reología del polvo) y de las interacciones que el mismo principio activo ejerza sobre si mismo (fuerzas de atracción y repulsión) (Bjerregaard *et al.*, 2001).

La fase interna, consiste de una distribución homogénea o heterogénea de partículas sólidas, teniendo un tamaño específico, la uniformidad es mantenida a lo largo de la suspensión o vehículo, mediante el uso de algún o algunos de agentes suspensores. Además

al contrario de las disoluciones las partículas suspendidas exhiben un grado mínimo de disolución en la fase externa. En una suspensión coloidal los sólidos son menores de 1 μm de tamaño. En una suspensión tosca los sólidos de menor tamaño son de aproximadamente 1 μm . El límite superior práctico, en una suspensión tosca es aproximadamente 50-75 μm cuando uno o más tipos de partículas sólidas constituyen la fase interna y estos tienen un efecto farmacéutico o fisiológico se conoce como suspensión farmacéutica (Cortes, 2005). Existen tres clases generales de suspensiones farmacéuticas que se administran en forma oral, tópicas (externas) y las inyectables (parenterales).

En base a la solubilidad y permeabilidad de los fármacos se usa la siguiente clasificación biofarmacéutica:

- I. Fármacos de alta solubilidad, alta permeabilidad, extenso metabolismo.
- II. Fármacos de baja solubilidad y alta permeabilidad, extenso metabolismo.
- III. Fármacos de alta solubilidad, baja permeabilidad, pobre metabolismo, eliminación renal o biliar.
- IV. Fármacos de baja solubilidad, baja permeabilidad, pobre metabolismo, eliminación renal o biliar (Amidon, 1995; Wu y Benet, 2005; Custodio *et al.*, 2008).

En la segunda clasificación se encuentra el compuesto Alfa por ello la dificultad técnica que representa hacerlo soluble y tenga una eficacia fasciolicida excelente.

I.4.1. Compuestos sólidos hidrofóbicos e hidrofílicos

Los sólidos solubles, sin tener en cuenta el tamaño de la partícula, tienen una tensión superficial baja en el agua y son llamados **sólidos hidrofílicos**, esta característica puede investigarse con un pequeño volumen de polvo de un compuesto con la ayuda de la absorción de humedad. Se consideran polvos insolubles a los que absorben humedad debajo de las humedades relativas de 70-80 % a temperatura ambiente. Los sólidos hidrofílicos pueden suspenderse fácilmente en agua sin la ayuda de un tensioactivo o agente de mojado. Sólidos finos insolubles que no son fácilmente humedecidos a través del agua y tienen una tensión interfacial relativamente alta son llamados **sólidos hidrofóbicos**. Estos incluyen un gran número de compuestos orgánicos de baja densidad y sustancias farmacéuticas. La

naturaleza de este último grupo esta acentuada por el aire atrapado o adsorbido en la superficie de estas partículas. Los materiales hidrofóbicos pueden ser disueltos o suspenderse fácilmente en aceites sin ayuda de un surfactante de lípidos. Los líquidos semipolares son llamados sólidos lipofílicos; recíprocamente los materiales hidrofílicos se comportan como los sólidos lipofóbicos en aceites (Yalkowsky y Valvani, 1980; Rowe *et al.*, 2006).

I.4.2. Consideración del tamaño de la partícula

El **tamaño y diámetro de la partícula**. La distribución del tamaño de partícula en fármacos insolubles son consideraciones importantes en la estabilidad de una suspensión farmacéutica. Así como es un factor importante en la apariencia del producto, en las proporciones y la solubilidad del fármaco, en la absorción *in vivo*, la facilidad para resuspender la suspensión y en la estabilidad misma. Las partículas de fármacos insolubles rara vez son esferas uniformes o cubos, aun después de la reducción del tamaño de la partícula. Las distribuciones amplias del tamaño de partícula generalmente llevan a una suspensión con una alta densidad. Los sistemas con diferentes formas (agujas, filamentos o prismas) con frecuencia producen suspensiones con una baja densidad (Rowe *et al.*, 2006). El crecimiento de cristales o el cambio en el tamaño de partícula en un fármaco en suspensión y fármacos ligeramente solubles pueden ocasionar problemas serios en la estabilidad de la suspensión y esto puede deberse a uno o más de los mecanismos siguientes.

1. Una disminución en el tamaño de partícula aumenta la solubilidad.
2. Un cambio en la temperatura de almacenamiento, mayor a 20° C.
3. Formas polimorfitas que cambian a otra cristalinas más estables. Los cambios en los cristales tienden a aumentar la solvatación o la hidratación.
4. Una reducción en el tamaño de partícula cambia el área de contacto con el líquido y eso puede aumentar o disminuir la solubilidad y por tanto aumentar o disminuir el tiempo que hay que agitar para incorporar el fármaco a la suspensión.
5. La distribución del tamaño de partícula en la mayoría de las suspensiones farmacéuticas es arriba de 1 μm .

6. La regla indica que si el compuesto tiene una solubilidad de $< 1\%$ (w/v) o 10 mg/ml en agua o búfer es necesario elevar la solubilidad del compuesto por medio de excipientes y vehículos (Medlicott *et al.*, 2004; Strickley, 2004).

I.4.3. Estabilidad de suspensiones

La estabilidad química de un fármaco en suspensión es controlada debido a que la degradación se relaciona con la concentración del fármaco en disolución, en lugar de la concentración total del fármaco en el producto. Generalmente un fármaco en suspensión solo se descompone gradualmente tanto como se disuelve la fase sólida, es decir siempre hay disuelta una parte igual del fármaco en la suspensión que corresponde a su solubilidad. La degradación de un fármaco en una suspensión generalmente sigue una cinética de orden cero. Con una proporción constante que depende de la solubilidad del fármaco en suspensión, disminuye la porción del mismo que se degrada. La potencia de una suspensión puede ser mejorada seleccionando un valor de pH o un intervalo donde el fármaco es menos soluble o una sal que no sea soluble en la fase dispersante. También puede describirse descomposición en suspensiones como una difusión controlada del proceso o catálisis iniciada por factores ambientales como oxígeno, luz y trazas de metales.

Es una regla que las suspensiones farmacéuticas son afectadas por factores tanto físicos como químicos. La predicción de la estabilidad es basada en las relaciones hidrostáticas simples como la Ley de Stoke's, etc. (Lieberman *et al.*, 1993).

Las predicciones de la estabilidad química son a menudo complicadas por la dificultad de determinar el pH dentro de la suspensión, porque a menudo hay cambios en la superficie del electrodo por las partículas que lo cubren, diferencias entre el volumen de suspensión e interacciones del sobrenadante con el vehículo. Una elevada temperatura acelera la prueba de estabilidad, frecuentemente produce efectos en la viscosidad, solubilidad de la partícula y tamaño de distribución (Lieberman *et al.*, 1993; Rowe *et al.*, 2006).

Si las partículas del fármaco son bastante pequeñas y el vehículo suficientemente viscoso, las partículas permanecen suspendidas indefinidamente de acuerdo con la ley de Stoke's. Esta ley también establece que al aumentar la viscosidad del medio de dispersión habrá una disminución de la viscosidad de sedimentación. Sin embargo hay que considerar que

suspensiones demasiado viscosas resultan difíciles de administrar y que una suspensión con un alto grado de viscosidad no garantiza que no se forme una torta en la suspensión (Lieberman *et al.*, 1993).

En la densidad de cristales o partículas de fármacos orgánicos se encuentra entre 1.1 y 1.5 g/cm³, en la práctica es difícil preparar suspensiones por emparejamiento de densidades, solo por que la dilución con agua y otros líquidos reducen la densidad del vehículo. No obstante el uso de líquidos de alta densidad como vehículos tiene un efecto benéfico en la estabilidad física (Lieberman *et al.*, 1993).

Las suspensiones de tipo permanente que tienen una viscosidad de menos de 0.14 cm por año a 25° C, pueden obtenerse con un líquido suspensor de una viscosidad de 1000 cp, con una diferencia de 0.2 g/cm³ o menos y un tamaño medio de la partícula del sólido suspendido de 0.2 µm. Este es un conjunto difícil de criterio que debe encontrarse para la mayoría de las suspensiones farmacéuticas (Cortes, 2005).

En la estabilidad se debe considerar el uso de un agente que reduzca la tensión interfacial entre el sólido y el vehículo; las propiedades electrónicas, evitar temperaturas extremas durante la producción o almacenamiento de la suspensión; recordar que la sobresaturación favorece la formación de cristales y desestabiliza la solución; un rápido cambio de calor y/o frío favorece la formación de cristales entre otros factores (Cortes, 2005).

I.4.4. Desarrollo de nuevas formulaciones

En el desarrollo de nuevas formulaciones se debe tener información relevante como: propósito del estudio, dosis, ruta, requerimientos de formulación, especie animal, estatus del compuesto etc., así como el conocimiento de cómo purificar y tener procedimiento disponible para la elaboración del compuesto (Medlicott *et al.*, 2004).

Es básico el estudio de las propiedades químicas y entender el potencial de la formulación, las propiedades químicas son la estructura, pKa, logP/log D, solubilidad, estabilidad, formación de cristales y amorfos, tamaño de la partícula, distribución, etc. (Medlicott *et al.*, 2004; Strickley, 2004).

Se debe tener conocimientos biológicos como en el sistema de permeabilidad gastrointestinal realizados con CACO.2 o PAMPA (parallel artificial membrana

permeability assay), estudios de metabolismo, sistema de transporte activo o interacción con P-glicoproteína interacción (P-gp) etc. (Strickley, 2004; Ping y Lowei, 2007).

El desarrollo de formulaciones de aplicación intramuscular solo requiere el compuesto de pasar una barrera protectora, pero esto se complica cuando los compuestos son hidrofóbicos como es el CP α y se dificulta obtener una presentación parenteral para evaluaciones preclínicas (Medlicott *et al.*, 2004).

Para la formulación de compuestos hidrofóbicos son comunes en su uso los cosolventes como etanol, propilénglicol y propilénglicol 400 son utilizados con este propósito (Akes, 2002; Strickley, 2004). Sin embargo, éstos no pueden ser utilizados en la administración parenteral de muchos compuestos, y también el uso puede causar la precipitación del compuesto diluido en algunos casos (Vyas, 1995). Otra desventaja incluye un severo dolor en el sitio de inyección y hemólisis limitada tolerada por el paciente en muchos casos (Bjerregaard *et al.*, 2001; Strickley, 2004).

Se debe evaluar la interacción entre la biología y el compuesto formulado, farmacología o efectos físicos en el sitio de acción y la relación entre la concentración y el efecto del compuesto. Se debe determinar la actividad, eficacia, selectividad, toxicidad, relación dosis efectividad, vía de administración, competencia con otros compuestos etc. (Rong-Kun *et al.*, 2004; Ping y Luwei, 2007).

En las soluciones y suspensiones se deben realizar estos estudios y que los vehículos utilizados en las formulaciones sean bien tolerados por el organismo donde es aplicado.

I.4.5. Las suspensiones parenterales

Los sólidos contenidos en las suspensiones parenterales normalmente están entre 0.5 y 5.0 %, salvo las formas insolubles de penicilina en las cuales las concentraciones de antibiótico pueden exceder del 30 %. Estas preparaciones estériles se usan en la vía intramuscular, intradérmica, intra-articular, o administración subcutánea. La viscosidad de las suspensiones parenterales debe ser baja para facilitar su administración. Los vehículos comunes para las suspensiones parenterales incluyen conservador 0.9 %, solución salina o un aceite vegetal aceptable. El primer factor que determina la selección del vehículo es la seguridad (Stickley, 2004).

Una suspensión es a menudo seleccionada como una forma de dosificación de fármacos insolubles y fluidos no acuosos cuando la forma de administración requiere que así sea, para que llegue a sitio de acción o para que no se comprometa su estabilidad y entonces es seguro .

Las suspensiones parenterales son una forma de dosificación ideal para liberaciones prolongadas. En la administración de un fármaco en suspensión acuosa u oleaginosa éste se libera constantemente del lugar de administración, y sea subcutáneo o intramuscular. El depósito actúa como reservorio del fármaco liberándose de éste lentamente, lo cual depende de la solubilidad relativa del fármaco a los fluidos del organismo en la zona aplicada, del vehículo en el cual fue suspendido, pero en general siempre se desea que sea una liberación prolongada, por lo cual se escogen vehículos que se permitan utilizar y que el daño sea mínimo o no exista en el sitio de aplicación. Las suspensiones parenterales son una forma de dosificación acuosa u oleaginosa se este liberando del lugar de administración, ya sea subcutáneo o intramuscular (Ping y Luwei, 2007).

I.4.6. La inyección intramuscular (IM)

Las soluciones y suspensiones que se aplican por vía intramuscular deben tener un pH 2-9, los cosolventes pueden ser usados en alta concentración casi como en la vía intravenosa. Otras formulaciones a base de lípidos o aceites pueden ser usados pero pueden tener un efecto en el sitio de aplicación, en general los compuestos administrados por esta vía son rápidamente absorbidos dentro la circulación general y el sistema linfático (Medlicott *et al.*, 2004; Ping y Luwei, 2007).

Para lograr la administración intramuscular de diversos compuesto se pueden utilizar: ciclodextrinas, cosolventes y surfactantes entre otros (Li *et al.*, 1999b), y cuando sea necesario ajustar el pH de la formulación.

Los cosolventes son sustancias que se sabe tienen la capacidad de solubilizar muchos compuestos de pobre solubilidad en agua (Yalkowsky, 1999). Los cosolventes más comunes son el etanol, propilénglicol (PG), propilénglicol 300 (PG300), propilénglicol 400 (PG400), glicerina, N,N-dimetil acetamida (DMA), glicerolformal (GF), dimetil sulfóxido

(DMSO) entre otros. Estos se han usado en administraciones orales y parenterales en dosis de más del 70-80 % en animales (Strickely, 2004).

Una de las mayores limitantes de su uso es que puede causar la precipitación del compuesto cuando esta dentro del cuerpo, la precipitación del compuesto o partículas pueden causar dolor en el sitio de aplicación, tromboflebitis, cambios en la sangre, pérdida de la bioviabilidad del compuesto (Vyas, 1995, Li *et al.*, 1999b; Akes, 2002; Strickley, 2004).

Para evitar esto se puede aplicar la menor cantidad de compuesto formulado, reducir la concentración del compuesto con el sistema de cosolventes y la incorporación de pequeños porcentajes de surfactantes en la formulación (Strickley, 2004)

En la formulación de compuestos de baja solubilidad en agua se ha encontrado que con la incorporación de pequeñas cantidades de surfactantes (0.5-0.5 %, w/v) en formulaciones con cosolventes, previene o reduce la precipitación del compuesto (Li *et al.*, 1999c; Strickley, 2004).

Los surfactantes evitan la precipitación de los compuestos en bajas concentraciones, los más comunes son Tween 80, Tween 20, derivados del aceite de castor como cremofor El, cremorfor RH40, RH60, etc. estos se deben usar con control del pH. La combinación del pH con surfactantes tiene buena efectividad de incrementar la solubilidad (Li *et al.*, 1999c).

I.4.7. Consideraciones en la formulación intramuscular del compuesto Alfa

Los resultados de los estudios del compuesto Alfa son prometedores en su administración oral en ovinos y bovinos. Pero se tiene la consideración que esta vía de administración no es práctica para el manejo de grandes cantidades de animales, en estos casos es mas adecuada la aplicación intramuscular. Sin embargo por su naturaleza estructural el compuesto Alfa es insoluble en agua, lo que ha imposibilitado su administración por vía intramuscular.

Para la síntesis del compuesto Alfa se parte de materias primas de fácil adquisición como son la 3,4-dicloroanilina y de pasos sencillos de síntesis, sin embargo los procesos de elaboración no son rápidos, por lo que obtener el principio activo es tardado, complejo y cada vez que se sintetiza tiene una apariencia diferente (color y tamaño de partícula),

debido a que no se tiene una técnica estandarizada de fabricación. Lo cual dificulta que se pueda tener un fármaco con características intrínsecas iguales.

El compuesto Alfa es casi insoluble en agua, fácilmente forma grumos al agregarlo al agua, solo se moja después de agitarlo vigorosamente. Su alta insolubilidad impide el uso de una forma farmacéutica disuelta en agua, por lo cual hay que mejorar su solubilidad para poder obtener una presentación inyectable intramuscular de fácil fabricación, económica, reproducible, estable y de alta eficiencia contra las formas juveniles y adultos de *Fasciola hepatica*.

La presentación inyectable se le debe analizar las características de solubilidad con los vehículos, se debe observar la apariencia de la solución en forma macroscópica y microscópica, la división de una fase clara (vehículo), densidad, color, tamaño de partícula, estabilidad, viscosidad, pH y evaluar la eficacia *in vitro* e *in vivo*.

Muchos de los principios activos en fase preclínica presentan problemas de insolubilidad acuosa, lo que limita las alternativas de formulación. En las últimas décadas se han utilizado varios procedimientos para tratar de resolver esta problemática. Dichos procedimientos son: la formación de complejos de inclusión, la síntesis de profármacos, la co-precipitación, la micronización de partículas y la generación de micro-emulsiones (Zingone y Rubessa, 2005). El uso de las ciclodextrinas para solubilizar diversos fármacos ha sido evaluado con buenos resultados, debido que alteran las propiedades físicoquímicas como la solubilidad en agua, estabilidad y biodisponibilidad (Muñoz-Botella *et al.*, 1995). Así como el uso de otros vehículos como el glicerolformal (GF) y el propilénglicol (PG).

En la formulación de nuevos compuestos se deben preparar para estudios en laboratorio *in vitro* y en animales *in vivo* como estudios preclínicos, y determinar la mejor ruta de administración del compuesto. Se debe tener suficiente evidencia *in vitro* para pasar a las evaluaciones *in vivo*, para seleccionar y optimizar los compuestos en su estudio como la farmacología, farmacocinética y toxicología.

Los principales aspectos que se deben resolver en el desarrollo de nuevas formulaciones son:

1. Tener eficacia *in vivo*. Lo cual es un requisito previo para evaluar en la respuesta biológica y farmacológica.

2. Dosis efectiva. Es necesario establecer la dosis con mejor efecto, con estabilidad física y química y el tiempo de almacenaje.
3. Determinar el efecto del vehículo utilizado. Se debe tener evidencia de que el vehículo y la formulación realizada tienen la máxima biocompatibilidad y ser tolerable *in vivo* (Medlicott *et al.*, 2004).

I.5. Vehículos utilizados en la formulación del compuesto Alfa

I.5.1. Ciclodextrinas

I.5.1.1. Características de las ciclodextrinas

La hidrólisis enzimática del almidón usualmente resulta en la formación de glucosa, maltosa y en una larga clase de dextrinas lineales y ramificadas. No obstante algunos microorganismos y plantas (que producen enzimas denominadas ciclodextrinas glicosiltransferasas) son capaces de degradar el almidón en productos cíclicos llamados ciclodextrinas (Loftson, 2001; Matioli, 2000; Ortega *et al.*, 2005).

La capacidad de formar complejos de inclusión, ya sea en estado sólido o en disolución, es una de las principales características de las ciclodextrinas. La inclusión tiene lugar gracias a que las moléculas huésped quedan atrapadas en el interior de la cavidad, siendo estable al aducto formado gracias a la estructura anular característica de las ciclodextrinas (Ortega *et al.*, 2005).

I.5.1.2. Clasificación de las ciclodextrinas

Las ciclodextrinas (CD) son macromoléculas formadas por distinto número de residuos de D (+) glucopirinoso unidos mediante enlaces alfa (1-4). Las más utilizadas son las alfa-beta- y gamma- CD que contienen 6, 7, 8 moléculas de glucopiranososa respectivamente. Estos agentes tienen una estructura de grupos hidroxilo primarios o secundarios orientados para el exterior. A pesar que son muy hidrosolubles, el interior de la cavidad relativamente hidrofóbica de las ciclodextrinas es apolar, por lo que son capaces de formar complejos de inclusión con distintos tipos de moléculas que se alojan en su interior. La estructura altera las propiedades físico-químicas como la solubilidad en agua, estabilidad y

biodisponibilidad de drogas complejas (McCormack y Gregoriadis, 1998; Muñoz *et al.*, 1995; Ortega *et al.*, 2005).

También mejoran la solubilidad de fármacos poco acuosolubles, los protege en su microambiente, forman y mantiene distribuciones homogéneamente estables, Proporcionan formas físicas más convenientes de suspensión a solución, aceite a sólido y altera sus propiedades físicas (Marques y Baptista, 1999a; Marques y Baptista, 1999b). Las moléculas complejas pueden tener un máximo contacto entre su superficie hidrofóbica y la cavidad polar, con una superficie hidrofílica en contacto con grupos hidroxilo presentes en las ciclodextrinas (Frömming y Szejtli, 1994; Muñoz *et al.*, 1995). La habilidad de las ciclodextrinas de formar complejos de inclusión depende esencialmente de la compatibilidad estérica de las polaridades de la droga. También forma fuerzas de dirección compleja atribuidas a la alta energía de repulsión del agua en la cavidad de las ciclodextrinas como interacciones de Van Der Waals, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, pueden tener una cavidad interna con un diámetro de 5 a 8 Å (Matioli, 2000), siendo lo bastante grande para acomodar un anillo aromático, caso contrario en la β -ciclodextrina (Kalinkova, 1999; Irie y Uekama, 1997). La disociación del fármaco es un proceso rápido, a menudo causado por el vertiginoso incremento en el número de moléculas de agua en el exterior de la cavidad. Aunque puede haber una barrera de energía inicial a la disociación, el gradiente de concentración creado se torna arrollador y el fármaco es desplazado quedando las moléculas del principio activo libres en el tracto gastrointestinal lo que se deriva, por consiguiente en una absorción fácil (Marques y Baptista, 1999a; Marques y Baptista 1999b). En general las ciclodextrinas se les ha estudiado extensamente sus características de solubilidad (Hirayama y Uekama, 1999), disolución (Ficarra *et al.*, 2000) y biodisponibilidad (Wong y Yuen, 2001).

1.5.1.3. Usos de las ciclodextrinas

La mayoría de las aplicaciones de las ciclodextrinas en la industria están encaminadas a mejorar las características del producto terminado como son la solubilidad y características organolépticas y el incrementar la estabilidad de los compuestos lábiles, facilita la absorción y liberación de los mismos. Así como la formación de complejos de inclusión

incrementa la selectividad y la sensibilidad de la mayoría de los métodos analíticos (Muñoz *et al.*, 1995).

Se ha demostrado que los complejos con ciclodextrinas (b-ciclodextrina como dextrina cíclica) en disolución son química y fotoquímicamente más estables que los correspondientes compuestos no incluidos. El incremento en la estabilidad se ha observado asimismo para la aspirina, el nitrocepan, algunos antiinflamatorios (piroxicam) (Dalamora *et al.*, 2001), el metronidazol, antitumorales (doxorubicina) (Kirchmeier *et al.*, 2001) así como ciertos antibióticos y anestésicos (Dollo *et al.*, 2000), antidiabéticos (tolbutamida) (Veiga *et al.*, 2000) y otros fármacos, que pueden ser administrados por diversas vías como subaracnoidea, venosa, muscular, peridural, oral, nasal y dérmica (Loftsson y Masón, 2001; Irie y Uekama, 1997; Thompson, 1997; Rong-Kun y Amir, 2004).

Las ciclodextrinas más utilizadas son la beta ciclodextrina debido al precio, disponibilidad y el tamaño de la cavidad. El tamaño de la cavidad es el común para las drogas farmacéuticas con pesos moleculares entre 200 y 800 g/mol (Waleczek *et al.*, 2003). El problema que presenta es su baja solubilidad en agua (18.5 g/l a 25° C).

En el caso de la alfa ciclodextrina, influyen las mismas características anteriores, pero con la diferencia que es la más pequeña de las tres, pero su cavidad permite que diversas drogas puedan fijarse. Estas dos son las que comúnmente se evalúan en fármacos debido al precio y el tamaño de su cavidad que es compatible con los diversos productos a evaluar. Caso contrario la gama-ciclodextrina, es más difícil de conseguir, tiene mayor costo, lo que impacta en los presupuestos de los proyectos.

I.5.2. Glicerolfomal (GF)

I.5.2.1. Características del glicerolfomal

Es una mezcla de dos isómeros: 5-hidroxi-1,3-dioxane y 4-hidroximetil-1,3-dioxalane, ($X_4H_8O_3$) los cuales están en proporción 60:40 respectivamente, peso molecular 104.10. Es de baja toxicidad para una gran variedad de aplicaciones farmacéuticas como el uso en aplicación intramuscular de desparasitantes.

I.5.2.2. Usos del glicerolformal

Con el glicerolformal (GF) y las combinaciones de vehículos se obtuvo un 100 % de concentración, debido a que es un solvente binario que puede solubilizar una gran variedad de compuestos que son hidrofóbicos e hidrofílicos, utiliza la cosolvencia para incrementar la solubilidad de compuestos en concentración aceptable para formulaciones intramusculares y mejora la biodisponibilidad de los principios activos poco polares y puede ser usado a altas dosis de más 4000 mg/kg en ratas (Sanderson, 1959; Rong-Kun y Amir, 2004; Kyu-Bong *et al.*, 2007).

La adecuada solubilidad obtenida por la cosolvencia de los vehículos ya ha sido evaluada en otros compuestos donde se evaluó la combinación del propilén glicol y el glicerolformal (60:40), a dosis de 200 mg/kg utilizado con éxito en la formulación de ivermectinas para ganado bovino (Lifschitz *et al.*, 2007).

El GF solubilizó la rifampicina en 100 % y el propilén glicol solo entre 15 y 30 % o menos utilizando los vehículos puros en mg/ml (Simamora *et al.*, 2001).

I.5.3. Propilén glicol (PG)

I.5.3.1. Características del propilén glicol

Su fórmula es 1,2- dihidroxipropano ($\text{CH}_3\text{CHOHCH}_2\text{OH}$), su peso molecular es 76.09.

I.5.3.2. Usos del propilén glicol

Con el propilén glicol (PG) no se obtiene una adecuada solubilidad debido probablemente a la densidad del vehículo, pero se ha notificado que su uso con HP- β -CD aumenta la solubilidad de compuestos (Rong-Kun y Amir, 2004).

En el desarrollo de formulaciones parenterales es más difícil en el caso de drogas hidrofóbicas como el compuesto Alfa lo cual dificulta la presentación parenteral para evaluaciones preclínicas, logrando la solubilidad la administración intramuscular solo requiere de pasar una barrera protectora para difundir adecuadamente y llegar al compartimiento vascular y llegar al sitio de acción; pero esto no es tan fácil debido a que también están implícitas las características físicoquímicas del compuesto solubilizado (Strickley, 2004).

I.6. Características del cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR)

El cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR), es un método utilizado para separar componentes en una mezcla y es muy específica para el reconocimiento de uno o varios analitos de interés y permite una excelente separación de los componentes individuales para reconocerlos fácilmente. Se le considera el procedimiento de elección en análisis de fármacos, desde la síntesis o el aislamiento de una droga potencial hasta la etapa final de la información de mantenimiento, el control de calidad de la dosis formulada (Evard *et al.*, 2002; García *et al.*, 2003; Raghavan y Joseph, 2002). También es útil para medir la concentración de compuestos que forman aductos con diversos fármacos y ciclodextrinas (Agueros *et al.*, 2005, Gazpio *et al.*, 2005, Rozou *et al.*, 2005),

El uso del CLAR en la determinación del compuesto Alfa y sus metabolitos sulfóxido y sulfona en suero de ovinos y bovinos ya ha sido evaluado, determinado que es un método seguro para el reconocimiento de este compuesto y sus metabolitos (Del Rivero *et al.*, 1998; Del Rivero, 1998a; Vértiz, 2000; Ramírez, 2007)

I.6.1. Flujo del cromatógrafo de líquidos de alta resolución

La muestra es inyectada por el auto muestreador, y la fase móvil metanol, es impulsada por la bomba de infusión, ambas pasan por la columna C18 la cual es denominada fase estacionaria. Al eluir el compuesto este pasa al detector de rayos ultravioleta el cual detecta la presencia del compuesto, después la información es transmitida a la interfase la cual integra la señal y la transfiere a la computadora para ser interpretada y graficada (Raghavan *et al.*, 2002; García *et al.*, 2002)

Para obtener los estándares de los cromatogramas de las muestras procesadas de solubilidad o suero se puede tomar en cuenta el área de la curva representada en el cromatograma y la altura de la curva, lo cual dependerá de cada compuesto evaluado.

Para la transformación del ancho de la señal del cromatograma a la concentración de los estándares (concentraciones conocidas), se realiza una regresión con un valor de R^2 0.999. De cada muestra el ancho de la señal del cromatograma se realiza el estimado de la

concentración utilizando la siguiente fórmula. $y = a + b * x$ donde a = intersección, b = pendientes y x = valor de la señal (García *et al.*, 2002).

Para determinar la concentración del compuesto solubilizado y en el suero se sumaron los anchos de columnas representadas en los cromatogramas del compuesto a evaluar (García *et al.*, 2002).

I.6.2. Validación del método analítico

El principal objetivo de la validación de un procedimiento es el demostrar que el equipo es apto para lo que se pretende utilizar.

Las características de validación son: La linealidad, selectividad, repetibilidad, precisión, exactitud, especificidad, límite mínimo de detección, el límite máximo de cuantificación y la estabilidad del compuesto.

Selectividad. Criterio de aceptación: No deben existir interferencias de los vehículos donde se solubilizó el compuesto Alfa, ni en los componentes del plasma en los tiempos de retención de los compuestos ni del estándar interno (Del Rivero *et al.*, 1998; Vértiz, 2000; García *et al.*, 2002; Ramírez, 2007).

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

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

Precisión del método. Precisión intradía (Repetibilidad). Criterio de aceptación: El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15 %.

Precisión interdía (Reproducibilidad). Criterio de aceptación: El coeficiente de variación no debe ser mayor al 15 %.

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

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

Estabilidad de muestra procesada. Criterio de aceptación: la desviación absoluta de los resultados obtenidos a las cero y a las 24 horas no debe ser mayor al 15 % (Del Rivero *et al.*, 1998; Vértiz, 2000; García *et al.*, 2002; Ramírez, 2007).

Para comprobar la **repetibilidad del método** se deben realizar diluciones de las soluciones madre de compuesto a evaluar. Al analizar las muestras se puede tomar en cuenta la altura de la señal de los cromatogramas, para la cuantificación y comprobar con un 99 % de confianza que las observaciones son iguales.

Para determinar la **precisión del sistema** se deben realizar inyecciones repetidas del estándar del compuesto a evaluar en el sistema CLAR, en donde se determinan la altura de la señal y el tiempo de retención. Los valores de la desviación estándar relativa deben ser inferiores al 2 %, lo que confirma la precisión del sistema analítico para el compuesto y sus metabolitos (Del Rivero *et al.*, 1998; Vértiz, 2000; García *et al.*, 2002; Ramírez, 2007).

La **exactitud del método** se evalúa determinando el porcentaje de recuperación de tres estándares, se realizan los cálculos se obtiene el límite que debe estar dentro del intervalo aceptado.

El **límite mínimo de detección (LD)** es la cantidad o concentración mínima detectable de un fármaco con cierta confiabilidad al utilizar un método establecido.

El **límite mínimo de cuantificación (LC)** es la concentración del compuesto a partir del cual es confiable realizar el análisis y las determinaciones: Este se puede obtener con la siguiente fórmula: $LC=LD*\text{Volumen de inyección/volumen de muestra}$ (Del Rivero *et al.*, 1998; Vértiz, 2000; García *et al.*, 2002; Ramírez, 2007)

I.7. Justificación

Los estudios del compuesto Alfa han mostrado una excelente eficacia fasciolicida *in vitro* e *in vivo* en ovinos y bovinos administrado por vía oral. Pero se tiene la consideración que esta vía de administración no es practica para el manejo de grandes cantidades de animales, en estos casos es mas adecuada la aplicación intramuscular. Sin embargo por su naturaleza estructural el compuesto Alfa, es poco soluble en agua, lo que imposibilita su administración por esta vía.

Muchos de los principios activos en fase preclínica presentan problemas de insolubilidad acuosa, lo que limita las alternativas de formulación. En las últimas décadas se han utilizado varios procedimientos para tratar de resolver esta problemática. Dichos procedimientos son: el uso de diferentes vehículos, la formación de complejos de inclusión, la síntesis de profármacos, co-precipitación, micronización de partículas y la generación de micro-emulsiones. Por tal motivo en el presente estudio se propone evaluar la relevancia de las ciclodextrinas: alfa-ciclodextrina, beta-ciclodextrina, hidroxipropil-beta ciclodextrina e hidroxipropil-alfa-ciclodextrina y de los cosolventes glicerolformal y propilén glicol para tratar de incrementar la solubilidad del compuesto Alfa; si resulta exitoso, se evaluará la eficacia fasciolicida *in vitro* e *in vivo*, para elaborar una formulación inyectable para uso en rumiantes.

Hipótesis

1. El compuesto Alfa solubilizado con diferentes vehículos tiene mayor eficacia contra *Fasciola hepatica in vitro* e *in vivo*, que una formulación oral.
2. La eficacia fasciolicida del compuesto Alfa es mayor al cambiar la ruta de administración de oral a intramuscular.

I.8. Objetivo General

Evaluar la solubilidad del compuesto Alfa con ciclodextrinas y cosolventes, y la eficacia fasciolicida *in vitro* e *in vivo* del compuesto formulado.

I.9. Objetivos específicos

1. Formar complejos de inclusión del compuesto Alfa con alfa ciclodextrina, hidroxipropil-alfa-ciclodextrina, beta-ciclodextrina e hidroxipropil-beta-ciclodextrina.
2. Solubilizar el compuesto Alfa con glicerolformal y propilenglicol.
3. Determinar la cantidad del compuesto Alfa solubilizado con cada vehículo por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución.
4. Evaluar *in vitro* la eficacia fasciolicida del compuesto Alfa solubilizado con cada vehículo.
5. Determinar el daño por histopatología que ocasiona el compuesto Alfa solubilizado en músculos de ratones.
6. Determinar la eficacia fasciolicida y farmacocinética del compuesto Alfa solubilizado y administrado por vía intramuscular en conejos infectados con metacercarias de *Fasciola hepatica*.
7. Evaluar la eficacia del fasciolicida del compuesto Alfa administrado por vía intramuscular en ovinos infectados con metacercarias de *Fasciola hepatica*.

I.10. Meta

Obtener una formulación inyectable por vía intramuscular del fasciolicida experimental compuesto Alfa.

I.11. Referencias

1. Agueros M, Campanero MA, Irache JM. Simultaneous quantification of different cyclodextrins and Gantrez by HPLC with evaporative light detection scattering detection. *Pharm Biomed Anal* 2005; 39: 495-502.
2. Alcalá Y, Ibarra F, García J, Sumano H. *Fasciola hepatica* proteolytic activity in liver revealed by *in situ* zymography. *Parasitol Res* 2005; 96: 308-311.
3. Amidon GL, Lennerna H, Shah VP, Crisol JR. A Theoretical Basis For a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of In vitro Drug Product Dissolution and In vivo Bioavailability. *Pharm Res* 1995; 12:413-420.

4. Akes ML. Excipient-drug interactions in parenteral formulations. *J Pharm Sci* 2002; 91:2283-2300.
5. Ayala AS. Evaluación toxicológica del compuesto fasciolicida alfa en vacas gestantes. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 2003.
6. Bjerregaard S, Pedersen H, Vedstesen H, Vermehren C, Soderberg I, Frokjaer S. Parenteral water/oil emulsions containing hydrophilic compound with enhanced *in vivo* retention: formulation, rheological characterization and study of *in vivo* fate using whole body gamma-scintigraphy. *Int J Pharm* 2001; 215:13-27.
7. Bossaert K, Lonneux JF, Godeau JM, Peeters J, Losson B. Serological and biochemical follow-up in cattle naturally infected with *Fasciola hepatica*, and comparison with a climate model for predicting risks of fasciolosis. *Vet Res* 1999; 3:615-628.
8. Boray JC. Chemotherapy of infections with Fasciolidae. In: Abstracts of the Villth ICOPA (M.A, Ózcel & M.Z. Alkan edit.), Vol. 1, Turkish Society for Parasitology Izmir. 1994; 97.
9. Castellanos HAA, Escutia SI, Quiroz RH. Frecuencia de fasciolosis hepática en bovinos sacrificados en las plantas tipo inspección federal en México de los años 1979-1987. *Vet Méx* 1992; 23:339-342.
10. Cruz MI, Figueroa JA, Correa D, Ramos ME, Lecumberri LJ, Quiroz RH. Dynamics of *Fasciola hepatica* infection in two species of snails in a rural locality of México. *Vet Parasitol* 2004; 87: 87-93.
11. Cortes FAC. Formulación de una suspensión para un fasciolicida. Tesis de licenciatura. Facultad de Química Universidad Nacional de Autónoma de México. 2005.
12. Custodio JM, Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food an drug absorption. *Ad Drug Del Rev* 2008; 68:717-733.
13. Dalmora ME, Dalmora SL, Oliveira AG. Inclusion complex of piroxicam with α -cyclodextrin and incorporation in cationic microemulsion. *In vitro* drug release and *in vivo* topical anti-inflammatory effect. *Int J Pharm* 2001; 222:45-55.

14. Del Rivero LM, Jung H, Castillo R, Hernández CA. High performance liquid chromatographic assay for a new fasciolicide agent α BIOF10 in biological fluids. *J Chrom B* 1998; 712:237-291.
15. Del Rivero RLM. Farmacocinética del α BIO10 en borregos. Tesis de Maestro en Farmacia (Biofarmacia). Facultad de Química. División de estudios de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México. 1998a.
16. Delatour P, Parish R. Benzimidazole anthelmintics and related compounds: Toxicity and evaluation of residues. In: *Drug residues in animals*. Ed. Rico, AG. Academic Press. New York. 1986; 175-203.
17. Dollo G, Le Corre P, Freville JC. Biopharmaceutics of local anesthetic cyclodextrin complexes following loco-regional administration. *Ann Pharm Fr* 2000; 58:425-432.
18. Dorchie P, Lahitte M. Study on activity of triclabendazole (DC1) against *Fasciola hepatica* in lambs. *Rev Med Vet* 1983; 134 (4): 231-234.
19. Dreyfuss G, Vignoles P, Abrous M, Rondellaud D. Unusual snail species involved in the transmission of *Fasciola hepatica* in watercress beds in central France. *Parasite* 2002; 9: 113-120.
20. Dunn MA. *Helminología Veterinaria*. 2ª ed. El Manual Moderno, S.A., México, D.F. 1982.
21. Encinas GR, Quiroz RH, Guerrero MC, Ochoa GP. Frecuencia de fasciolosis hepática e impacto económico en bovinos sacrificados en Ferrería México, D.F. *Vet Méx* 1989; 20:423-426.
22. Evard A, Chiap P, Tullio PD, Ghalmi F, Piel G, Van Hess T, Crommen J, Corson B, Delattre L. Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from solution containing hydroxypropyl beta cyclodextrin. *J Cont Rel* 2002; 85: 45-50.
23. Fairweather I, Boray JC. Fasciolicides: Efficacy, Actions, Resistance and its Management. *Vet J* 1999; 158: 81-112.
24. Ficarra R, Ficarra P, Di Bella MR, Raneri D, Tommasini S, Calabro ML, Villari A, Coppolino S. Study of the inclusion complex of atenolol with beta-cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal* 2000; 23:231-236.

25. Frömming KH, Szejtli J. Topics in Inclusion Science - Cyclodextrins in Pharmacy, 1st Ed. Hungría, Kluwer Academic Publishers, 1994; 50-51.
26. García AM, Soberón E, Cortés M, Rodríguez R, Herrera JL, Alcántara A. Métodos analíticos. Guía de validación. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos, A.C. 2002. Pág. 20-50.
27. García JJ, Bolas F, Torrado JJ. Bioavailability and efficacy characteristics of two different oral liquid formulation of albendazole. Int J Pharm 2003; 250:351-358.
28. Gazpio C, Sánchez M, García ZXI, Velaz I, Martínez OC, Martín C, Zornoza A. HPLC and solubility study of the interaction between pindolol and ciclodextrins. J Pharm and Bio Anal 2005; 37: 487-492.
29. Georgi JR, Marion EG. Parasitology for veterinarians. Fifth edition. W.B. Saunders Company. U.S.A. 1990.
30. Hernández CA, Ibarra VF, Vera MY, Rivera FN, Castillo BR. Synthesis and Fasciolicidal Activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)-1*H*benzimidazole. Chem Pharm Bull 2002; 50(5): 649-652.
31. Hirayama F, Uekama K. Cyclodextrin-based controlled drug release system. Adv Drug Rev 1999; 36:125-141.
32. Ibarra VF. Control químico de la fasciolosis. En: Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre. Editor. Héctor Quiroz Romero. Dedicado a la memoria del Dr. Manuel Chavarría Chavarría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria 1991:275-297.
33. Ibarra VF. Avances de investigación en fasciolosis En: Temas Selectos de Parasitología. Ed. Héctor Quiroz Romero y Froylán Ibarra Velarde. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. 2000a; Volumen 1: Pág. 42-48.
34. Ibarra VF, Montenegro CN, Flores CJ, Hernández CA, Castillo BR. Evaluación de 4 vehículos para formular un fasciolicida experimental. Vet Méx 2000b; 31: (1) 47 - 51.
35. Ibarra VF, Cristino MN, Vera MY, Castillo BR, Hernández CA, Ochoa GP: Eficacia comparativa de un fasciolicida experimental, triclabendazol y closantel en bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*. Vet Méx 2002; 33: 24-29.

36. Ibarra FV, Vera MY, Quiroz RH, Cantó J, Castillo BR, Hernández A, Ochoa P. Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. *Vet Parasitol* 2004;120: 65-74.
37. Irie T, Uekama K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J Pharm Sci* 1997; 86:147-62.
38. Kalinkova GN. Studies of beneficial interactions between active medicaments and excipients in pharmaceutical formulations. *Int J Pharm* 1999; 187:1-15.
39. Kassai T, Cordero CM, Euzeby J, Gaafar S, Hiepe Th, Himonas CA. Standardized nomenclature of animal parasitic diseases (SNOAPAD). *Vet Parasitol* 1988; 29:299-326.
40. Kinabo LD, Mckellar QA, Eckersall PD. Isometamidium in pigs: disposition kinetics, tissue residues and adverse reactions. *Res Vet Sci* 1991; 50 (1): 6-13.
41. Kirchmeier MJ, Ishida T, Chevrette J. Correlations between the rate of intracellular release of endocytosed liposomal doxorubicin and cytotoxicity as determined by a new assay. *J Liposome Res* 2001; 11:15-29.
42. Kyu-Bong K, Sathanandam SA, Srinivasa M, Hyo JK, James VB. Formulation-dependent toxicokinetics explains differences in the GI absorption, bioavailability and acute neurotoxicity of deltamethrin in rats. *Toxicol* 2007; 234:194-202.
43. Lieberman HA, Rieger MM, Banker GS. Pharmaceutical dosage forms disperse system. Vol 3. Cap. 2. Theory of Suspension 1993. 13-47.
44. Li P, Tabibi SE, Yalkoswsky SH. Solubilization of flavopiridol by pH control combined with cosolvents, surfactants, or complexants. *J Pharm Sc* 1999b; 88:945-947.
45. Li P, Tabibi SE, Yalkoswsky SH. Solubilization of ionized and unionized flavopiridol by ethanol and polysorbate 20. *J Pharm Sc* 1999c; 88:507-509.
46. Lifschitz A, Virkel G, Ballent M, Sallovitz J, Imperiale F, Pis A, Lanusse C. Ivermectin (3.15%) long acting formulations in cattle: absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Vet Parasitol* 2007; 147:303-310.
47. Loftsson T, Masson M. Cyclodextrins in topical drug formulations: theory and practice. *Int J Pharm* 2001; 225:15-30.

48. Mackellar KA, Kinabo LDB. The pharmacology of flukicidal drugs. *Brit Vet J* 1991; 147: 306-321.
49. Mas-Como S, Esteban JC, Bargues MD. *Fasciola hepatica* and lymnaeid snails at very high altitud in South America. *Parasitology* 2001; 123:S115-S127.
50. Mas-Coma MS, Esteban JG, Bargues MD. Epidemiología de la fasciolosis humana: revisión y propuesta de nueva clasificación. *Bulletin of the World Health Organization* 1999; 77(4):340-346.
51. Marín MS, Prieto M, Cármenes RS, Boga JA, Casais R, Martín JM, Parra F. Fasciolosis bovina. *Mundo Ganadero* 1993; 9:76-81.
52. Marques FC, Baptista VFJ. As ciclodextrinas na tecnologia farmaceutica: I. Producción, estructura y propiedades. *Revista de Ciencias Farmacêuticas, Sao Paulo* 1999a; 20(2): 335-351.
53. Marques FC, Baptista VJB. As ciclodextrinas na tecnologia farmaceutica: II. Formacao e deteccao dos complexos de inclusao em solucao, *Revista de Ciencias Farmaceuticas, Sao Paulo* 1999b; 20(2): 353-373.
54. Matioli G. Ciclodextrinas e suas aplicações em alimentos, fármacos, agricultura, biotecnología, química analítica e produtos gerais. 1ª Ed. Maringá, Eduem 2000;3-5.
55. McConville M. Evaluation of a novel benzimidazole compound against triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. Bachelor of Science (Honours) Degree. Biological Science. School of Biology and Biochemistry. The Queen's University of Belfast. 2004.
56. McCormack B, Gregoriadis G. Drugs-in-cyclodextrins-in-liposomes: an approach to controlling the fate of water insoluble drugs *in vivo*. *Int J Pharm* 1998; 162:59-69.
57. Medlicott NJ, Waldron NA, Foster TP. Sustained release veterinary parenteral products 2004; 56:1345-1365.
58. Montgomery TH. Improving the consistency and competitiveness of beef. National Beef Quality audit-1991. 1992. pp 144-147. National Cattlemen's Association, Denver, CO.

59. Moukrim A, Rondelaud D. First epidemiological studies of *Fasciola hepatica* infection in cattle in the Oued Massa Valley Morocco. *Rev Vet Bull* 1992; 5(62):10.
60. Muñoz BS, Del Castillo B, Martí, MA. Las ciclodextrinas: características y aplicaciones de la formación de complejos de inclusión. *Ars Pharm* 1995; (2):187-198.
61. Ortega LSM, Passos M, Fontana JD. Bixin and alfa-cyclodextrin inclusión complex and stability test. *Process Biochemistry* 2005; 40: 865-872.
62. Over HJ. Ecological basis of parasite control: trematodes with special reference to fascioliasis. *Vet Parasitol* 1982; 11:85-97.
63. Ping L, Luwei Z. Developing early formulations: Practice and prespective 2007; 341:1-19.
64. Pfister K. Serodiagnosis of fasciolosis in rumiantes. *Rev Sci Tech de L'O.I.E.* 1990; 9:511-518.
65. Quiroz RH. Epidemiología. En Flores CR, Quiroz RH, Ibarra VF. Editores. Fasciolosis, volumen conmemorativo del Centenario del Descubrimiento del Ciclo de *Fasciola hepatica*. Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias. México, D.F., 1986; 335-403.
66. Quiroz RH. Parasitología y enfermedades parasitarias en animales domésticos. Limusa. México, 1984.
67. Quiroz RH. Epidemiología de Fasciolosis. En Control de enfermedades parasitarias en el ganado bovino. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. División de Educación Continua. Departamento de Parasitología. México, D.F. 1996.
68. Quiroz RH, Castellanos HAA. Diagnóstico de la prevalencia de *Fasciola hepatica* de bovinos sacrificados en empacadoras y rastros de México. En Quiroz RH, editor. Diagnóstico y control de parásitos de animales y el hombre. Universidad Nacional Autónoma de México y División del Sistema Universidad Abierta. México, D.F. 1991; 335-360.
69. Raghavan R, Joseph JC. Chromatographic methods of Analisis-High-Performance Liquid-Chromatography. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology.* 2002: 414-425.

70. Ramírez ANA. Estudios biofarmacéuticos del α BIOF10 un nuevo agente fasciolicida. Facultad de Química. Tesis de grado de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma México. México, D.F. 2007.
71. Rangel RLJ, Martínez DE. Pérdidas económicas por decomiso de hígados y distribución geográfica de la fasciolosis bovina en el estado de Tabasco, México. *Vet Méx* 1994; 25:327-331.
72. Rangel R, Márquez R, Baru N. Bovine Fasciolosis in Tabasco México. *Vet Parasitol* 1999; 81 (2): 119-127.
73. Reinhard EG. Landmarks of parasitology. I. The discovery of the cycle of the liver fluke. *Exp Parasitol* 1967; 6:208-232.
74. Rivera FN, Ibarra VF, Olazarán JS, Vera MY, Castillo BR, Hernández CA. Eficacia del 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy) benzimidazole contra diversas edades de *Fasciola hepatica* en ovinos. *Vet Méx* 2002; 33(1): 55 – 61.
75. Rivera N, Ibarra F, Zepeda A, Fortoul T, Hernández A, Castillo R, Cantó G. Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment in vitro and in vivo with an experimental fasciolicide. *Parasitol Res* 2004; 93: 283-286.
76. Rivera N, Ibarra F, Zepeda A, Fortoul T, Cantó G, Hernández A, Castillo R. The effect of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1*H*-benzimidazole called compound alpha on the tegument of immature *Fasciola hepatica* in its natural host. *Parasitol Res* 2005; 95:379-382.
77. Rong-Kun Ch, Amir HS. Effect of Hydroxypropyl-B-cyclodextrin on drug solubility in water-propylene glycol mixtures. *Drug develop and indus pharm* 2004; 30 (3): 297-302.
78. Rowe RC, Weller PJ, Own CS. Handbook of pharmaceutical excipients. Pharmaceutical press & American pharmaceutical association. Fifth edition. 2006. 108-110, 161-163.
79. Rozou S, Michaleas S, Antonoidou VZ. Study of structural features and thermodynamic parameters, determining the chromatographic behavior of drug-cyclodextrin complexes. *J Chrom A* 2005; 1087: 86-94.
80. Sanderson DM. A note on glycerol formal as a solvent in toxicity testing. *J Pharm Pharm* 1959; 11: 150-156.

81. Simamora P, Alvarez JM, Yalkowsky SH. Solubilization of rapamycin. *Inter J Pharm* 2001; 213: 25-29.
82. Soulsby EJJ. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos 7ª Ed.* Nueva Editorial Interamericana. México D.F., 1987.
83. Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res* 2004; 21:201-230.
84. Sumano H, Ocampo L. *Farmacología Veterinaria.* Ed. McGraw-Hill Interamericana. 2006.
85. Thompson D.O. Cyclodextrins—enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1997; 14: 1–104.
86. Veiga F, Fernandez C, Teixeira F. Oral availability and hypoglycaemic activity of tolbutamide/cyclodextrin inclusion complexes. *Int J Pharm* 2000; 202:165-171.
87. Vera MY, Ibarra VF, Quiroz RH, Ríos UA, Castillo BR, Hernández CA. Eficacia del 6- cloro-2-metil-5-(1-naftiloxi) bencimidazol contra *Fasciola hepatica* de cuatro y diez semanas de edad en bovinos de México. *Vet Méx* 2001; 32(1):77- 80.
88. Vera Y, Ibarra F, Cantó GJ, Soria O, Castillo R, Hernández A. Determination of the maximum tolerated dose and the safety index of an experimental fasciolicide in cattle. *J Vet Med B.* 2006; 53: 145-149.
89. Vértiz SG. Evaluación farmacocinética de α BIO10 en ganado vacuno. Tesis de Maestra en Farmacia (Biofarmacia). Facultad de Química. División de estudios de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma México. 2000.
90. Vyas DM. Paclitaxel (Taxol) formulations and prodrugs. In: Farina. V. (Ed.) *The Chemistry and Pharmacology of Taxol and its Derivates.* Elsevier Science. 1995. British Vanciuver.
91. Waker K, Roffeis N, Conrths JF. Cow-calf herds in eastern Germany: status quo of some parasite species and a cooperation chemotherapy and pasture management in the control of gastrointestinal nematodes. *Zentralbl Veterinarmed* 1999; 46 (7): 475- 83.
92. Wariuri RM, Kgusgaard NC, Thamsborg SM, Mansen P, Bogh HO, Munyua WK, Bathuma JM. The prevalence and intensity of helminthes and coccidian infection in dairy cattle in central Kenya. *Vet Res Comm* 2000; 24(1): 39-53.

93. Waleczek KJ, Cabral MHM, Hempel B., Schmidt PC. Phase solubility studies of pure (-) alga-bisabolol and chamomile essential oil beta-cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 55:247-251.
94. Wong JW, Yuen KH. Improved oral bioavailability of artemisinin through inclusion complexation with beta and gama cyclodextrin. *Int J Pharm* 2001; 227:177-185.
95. Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res* 2005; 22(1): 11.23.
96. Yalkowsky SH. Solubility and solubilization in aqueous media. 1999. Oxford University Press.
97. Yalkowsky SH, Valvani SC. Solubility and partitioning I: solubility of nonelectrolytes in water. *J Pharm Sci* 1980; 69: 912-922.
98. Zingone G, Rubessa F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin-beta-cyclodextrin. *Inter J Pharm* 2005; 291: 3-10.

II. EXPERIMENTO 1. SOLUBILIDAD DEL COMPUESTO ALFA CON CICLODEXTRINAS, GLICEROLFORMAL Y PROPILÉNGLICOL

II.1. Resumen

El compuesto Alfa ($CP\alpha$) es un derivado de los bencimidazoles que ha demostrado alta eficacia contra *Fasciola hepatica* administrado por vía oral. El compuesto es lipofílico e insoluble en agua, para ser solubilizado se tienen alternativas como las ciclodextrinas, propilénglicol y glicerolformal los cuales modifican las características físicoquímicas de los fármacos.

El objetivo fue dar solubilidad al $CP\alpha$ por medio de la formación de aductos con ciclodextrinas y el uso de cosolventes. La solubilidad se cuantificó por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Los resultados muestran que la alfa ciclodextrina e hidroxipropil-beta-ciclodextrina no solubilizaron, la hidroxipropil-beta-ciclodextrina solubilizó en 1.018 % y la beta ciclodextrina en 0.051 %. La hidroxipropil-beta-ciclodextrina mostró mejores propiedades para solubilizar y se evaluó en 5 concentraciones de las cuales el $CP\alpha$ a 5.8 mg se solubilizó en 3.95 %, también se evaluó combinada con metanol y se obtuvo un 10.76 % de solubilidad; se utilizaron otros vehículos como propilénglicol en 39.048 %, glicerolformal en 100 %, la combinación glicerolformal con propilénglicol y agua en proporciones 3:2:4 y 3:2:5 tuvieron 100 % de solubilidad del $CP\alpha$.

Se concluye que el glicerolformal y la combinación de glicerolformal con propilénglicol y agua dan solubilidad al compuesto Alfa del 100 %, los cuales se utilizaron como modelo para evaluar la eficacia *in vitro* sobre *Fasciola hepatica*.

Palabras clave: Solubilidad, vehículos, CLAR, bencimidazol, *Fasciola hepatica*.

II.2. Introducción

Un nuevo fasciolicida derivado de los bencimidazoles fue sintetizado el 5-cloro-2-metil-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol, llamado compuesto Alfa (Hernández *et al.*, 2002). Este compuesto ha mostrado una eficacia fasciolicida excelente y muy promisorio bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* por vía oral en ovinos (García, 1993; Ibarra *et al.*, 1996; Ibarra *et al.*, 1997b; Rivera *et al.*, 2002) y en bovinos (Ibarra *et al.*, 2000b; Ibarra *et al.*, 2002; Ibarra *et al.*, 2004).

El compuesto Alfa (CP α) como derivado de los bencimidazoles tiene una nula o pobre solubilidad en agua (H₂O) y es de baja absorción en el tracto gastrointestinal (Evard *et al.*, 2002), lo cual reduce su capacidad de ser utilizado en otras formas de administración. Para aumentar su solubilidad acuosa de compuestos, se utilizan vehículos que pueden formar complejos de inclusión como son las ciclodextrinas (CD): alfa ciclodextrina (α -CD), hidroxipropil-alfa-ciclodextrina (HP- α -CD), beta ciclodextrina (β -CD) y hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- β -CD); así como el uso de cosolventes como el propilenglicol (PG) y glicerolformal (GF) los cuales aumentan la solubilidad en agua, estabilidad química, modifican la absorción y la concentración del compuesto en sangre (Lo *et al.*, 1985; Wicks *et al.*, 1993), mejoran su farmacocinética (Lo *et al.*, 1985; Lanusse *et al.*, 1997; Lifschitz *et al.*, 1999) y favorecen que el compuesto llegue con efectividad donde se localiza el parásito (Lifschitz *et al.*, 2000); estos vehículos se utilizarán para dar solubilidad al CP α , si los resultados son promisorios se realizarán estudios para evaluar su eficacia *in vitro* contra *Fasciola hepatica*.

Objetivo.

Solubilizar el compuesto Alfa por medio de diferentes vehículos y determinar la solubilidad por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución.

II.3. Material y métodos

Compuesto Alfa.- El compuesto Alfa se sintetizó en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (Hernández *et al.*, 2002).

Vehículos.- Ciclodextrinas (CD): α -CD, HP- α -CD, β -CD e HP- β -CD y los cosolventes PG y GF, que fueron obtenidos de una fuente comercial.

Solubilidad.- Se realizó la formación de aductos del CP α con las CD con el siguiente procedimiento: el CP α (2 mg) se suspendió en una solución acuosa (H₂O) con cada ciclodextrina (3 mg) por triplicado (Evard *et al.*, 2002), se agitó por 7 días a temperatura ambiente. La ciclodextrina que proporcionó mayor hidrosolubilidad se evaluó en las concentraciones 5.8, 2.9, 1.45, 0.725, 0.0362 mg con 2 mg de CP α . Otros ensayos realizados fueron con HP- β -CD y metanol (MeOH) evaporado al medio ambiente y resuspendido en agua, CP α con PG, CP α con GF y la combinación de GF con PG y H₂O en proporción 3:2:4 y 3:2:5. Se utilizó una concentración de HP- β -CD 3.0 mg y de CP α 2.0 mg en cada ensayo por triplicado y cada muestra se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa, para ser inyectado en el CLAR. Se determinó la solubilidad en forma física por transparencia de los vehículos con el compuesto y por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (Athanassiou *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2003 y Zingone y Rúbeas, 2005).

Condiciones cromatográficas.- Se utilizó un sistema cromatográfico con bomba binaria, automuestreador y detector de arreglo de diodos, a una longitud de onda de 304 nm. La fase móvil consistió en metanol, agua y acetonitrilo (40:40:20 v/v/v) en grado CLAR, degasificador en línea con helio. La fase estacionaria consistió en una columna C18 de 80 mm de longitud. La suspensión a evaluar se filtró con membrana 0.45- μ m (Millex- LCR syringe driven filter units Millipore), se inyectaron 25 microlitos de muestra, el flujo isocrático de 1.5 ml/min. El tiempo de corrida fue de 8 minutos, el tiempo de retención

para el CP α fue de 1.5 minutos. Los límites de cuantificación fueron establecidos midiendo la mas baja concentración con un porcentaje de recuperación de 82.26, coeficiente de variación (CV) 4.5 %, coeficiente de correlación de 0.99, desviación estándar de 3.70 y variación entre ensayos o interlaboratorios de 8.683. El límite de detección del equipo para el CP α solubilizado con los diferentes vehículos fue de 50 ng/ml.

La linealidad fue establecida con la concentración detectada por las muestras de vehículos y suero en relación a las muestras estándar a diferentes concentraciones (por triplicado).

Para la calibración de las curvas fueron calculados por medio de análisis de regresión lineal, coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de variación (CV).

Para obtener los estándares de los cromatogramas de las muestras de solubilidad, se tomo en cuenta el área de la curva representada en el cromatograma para realizar la integración total del compuesto.

Para la transformación del ancho de la señal del cromatograma a la concentración de los estándares (concentraciones conocidas), se realizó una regresión con un valor de $r^2=0.999$. De cada muestra el ancho de la señal del cromatograma se realizó el estimado de la concentración utilizando la siguiente fórmula. $y = a + b * x$ donde a = intersección, b = pendientes y x = valor de la señal. Para determinar la concentración del compuesto solubilizado y en el suero se sumaron los anchos de columnas representadas en los cromatogramas del CP α .

Para el cálculo de la concentración del compuesto se empleo un estándar externo, con el método de adición se determinó el porcentaje de recuperación de la técnica analítica para establecer el porcentaje de recuperación del compuesto durante la extracción (Del Rivero *et al.*, 1998).

II.4. Resultados

El cuadro 1 muestra que la HP- α -CD e α -CD no solubilizaron al CP α , la β -CD solubilizó en 0.051 %, HP- β -CD en 1.018 %, HP- β -CD con 5.8 mg en 3.95 %, con HP- β -CD y metanol en 10.76 %, con PG en 32.5 %, con GF en 100 %, la combinación GF con PG y H₂O en proporciones 3:2:5 y 3:2:4 en 100 %. El límite de detección del equipo cromatográfico fue

de 50 ng/ml, lo cual demuestra que fue validada la técnica para detectar el CP α solubilizado.

Las figuras 1, 2, 3 y 4 muestran la representación gráfica de la determinación de la solubilidad con las diferentes ciclodextrinas por medio del CLAR.

La figura 5 muestra los estándares del CP α determinados por medio del CLAR.

Las figuras 6, 7, 8, muestran la representación gráfica de la solubilidad del CP α con HP- β -CD, PG y GF, determinado por medio del CLAR.

II.5. Discusión

En el cromatógrafo de líquidos de alta resolución se utilizó para determinar la presencia del CP α solubilizado, por lo cual se demuestra que es un método adecuado para separar componentes en una mezcla, y es muy específica para el reconocimiento de uno o varios analitos de interés y permite una excelente separación de los componentes individuales para reconocerlos fácilmente (Evard *et al.*, 2002; García *et al.*, 2003; Raghavan, 2002).

La hidrosolubilidad de la HP- β -CD detectada por el CLAR se puede deber a que en general la estequiometría de la mayoría de los complejos formados con CDs tienen una relación 1:1 (Brewster y Loftsson, 2007), al aumentar la concentración HP- β -CD se incremento la solubilidad del CP α , lo cual se debe a la mayor cantidad de moléculas de HP- β -CD lo que favorece la formación de aductos entre los dos compuestos.

La HP- β -CD con metanol mejoró la solubilidad del CP α en 10.95 %, debido al tamaño de la cavidad (Pitha *et al.*, 1986), baja solubilidad en agua de 18.5 g/l a 25° C (Zingone y Rubessa, 2005), para compuestos farmacéuticos con pesos moleculares entre 200 y 800 g/mol (Waleczek *et al.*, 2003) se tiene una solubilidad acuosa del 60 % (w/v) (Pitha *et al.*, 1986) la solubilidad obtenida fue baja debido probablemente al peso molecular del CP α y a la estequiometría de la mayoría de los complejos formados con CDs en relación 1:1, lo cual disminuye la disponibilidad de formar aductos.

Este resultado contrasta con las observaciones notificadas donde la HP- β -CD aumentó la solubilidad en agua del albendazol (Evard *et al.*, 2002; García *et al.*, 2003).

El PG no mostró una adecuada solubilidad debido probablemente a la densidad del vehículo, pero se ha notificado que su uso con HP- β -CD aumenta la solubilidad de compuestos (Rong-Kun y Amir, 2004).

Con el GF y la combinación de vehículos GF con PG y agua se obtuvo un 100 % de solubilidad, lo cual se debe a los vehículos utilizados son solventes binarios y pueden solubilizar una gran variedad de compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos, asimismo la cosolvencia puede incrementar la solubilidad de compuestos en concentración aceptable para formulaciones intramusculares, y mejora la biodisponibilidad de los principios activos poco polares y puede ser usado a altas dosis de más 4000 mg/kg en ratas (Sanderson, 1959; Rong-Kun, 2004; Kyu-Bong *et al.*, 2007).

El CP α fue solubilizado con éxito con cosolventes los cuales se han utilizado con éxito en la formulación de ivermectinas y rimfampicina (Simamora *et al.*, 2001; Lifschitz *et al.*, 2007).

Como parte de la secuencia de la elaboración de una nueva formulación, se requiere realizar ensayos para evaluar la eficacia fasciolicida *in vitro* del CP α solubilizado.

II.6. Conclusión

El compuesto Alfa fue solubilizado al 100 % con glicerolformal y la combinación glicerolformal con propilén glicol y agua.

II.7. Referencias

1. Athanassiou G. Antimicrobial activity of beta-lactam antibiotics against clinical pathogens after molecular inclusion in several cyclodextrins. A novel approach to bacterial resistance J Pharm Pharmacol 2003; 55:291–300.
2. Brewster ME, Loftsson T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. Ad Drug Deliver Rev 2007; 59:645-666.
3. Del Rivero LM, Jung H, Castillo R, Hernández CA. High-performance liquid chromatographic assay for a new fasciolicide agent, α BIOF10, in biological fluids. J Chrom B 1998; 72:237-241.

4. Evard A, Chiap P, Tullio PD, Ghalmi F, Piel G, Van Hess T, Crommen J, Corson B, Delattre L. Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from solution containing hydroxypropyl beta cyclodextrin. *J Cont Rel* 2002; 85:45-50.
5. García SE. Evaluación antihelmíntica de dos compuestos de síntesis química contra *Fasciola hepatica* en ovinos infectados experimentalmente. Tesis profesional de Licenciatura. Instituto Tecnológico Agropecuario No. 9, DGETA, Secretaría de Educación Pública, Cuernavaca, Morelos. 1993.
6. García JJ, Bolas F, Torrado JJ. Bioavailability and efficacy characteristics of two different oral liquid formulation of albendazole. *Int J Pharm* 2003; 250:351-358.
7. Hernández CA, Ibarra VF, Vera MY, Rivera FN, Castillo BR. Synthesis and Fasciolicidal Activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1Hbenzimidazole. *Chem Pharm Bull* 2002; 50:649-652.
8. Ibarra VF, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia de un compuesto experimental contra *Fasciola hepatica* juvenil y adulta en ganado ovino. *Vet Méx* 1996; 27:119-122.
9. Ibarra VF, Vera MY, Hernández CA y Castillo BR. Eficacia fasciolida del compuesto "alfa" contra estadios juveniles y adultos en ovinos. *Vet Méx* 1997b; 28:297- 301.
10. Ibarra VF, Montenegro CN, Flores CJ, Hernández CA, Castillo BR. Evaluación de 4 vehículos para formular un fasciolida experimental. *Vet Méx* 2000b; 31:47-51.
11. Ibarra VF, Cristino MN, Vera MY, Castillo BR, Hernández CA, Ochoa GP. Eficacia comparativa de un fasciolida experimental, triclabendazol y closantel en bovinos infectados en forma natural con *Fasciola hepatica*. *Vet Méx* 2002; 33:24-29.
12. Ibarra FV, Vera MY, Quiroz RH, Cantó J, Castillo BR, Hernández A, Ochoa P. Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. *Vet Parasitol* 2004; 120:65-74.
13. Kyu-Bong K, Sathanandam SA, Srinivasa M, Hyo JK, James VB. Formulation-dependent toxicokinetics explains differences in the GI absorption, bioavailability and acute neurotoxicity of deltamethrin in rats. *Toxicol* 2007; 234:194-202.

14. Lanusse C, Lifschitz A, Virkel G, Alvarez L, Sánchez S, Sutra JF, Galtier P, Alvineire M. Comparative plasma disposition kinetics of ivermectin, moxidectin and doramectin in cattle. *J Vet Pharmacol Ther* 1997; 20:91-99.
15. Lifschitz A, Virkel G, Pis A, Imperiale F, Sánchez S, Álvarez L, Kujanek R, Lanusse C. Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle. *Vet Parasitol* 1999; 86:203-215.
16. Lifschitz A, Virkel G, Sallovitz J, Sutura J.F, Galtier P, Alvineire M, Lanusse C. Comparative distribution of ivermectin and doramectin to tissues of parasite location in cattle. *Vet Parasitol* 2000; 87:327-338.
17. Lifschitz A, Virkel G, Ballent M, Sallovitz J, Imperiale F, Pis A, Lanusse C. Ivermectin (3.15 %) long acting formulations in cattle: absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Vet Parasitol* 2007; 147:303-310.
18. Lo P, Fink D, Williams J, Blodinger J. Pharmacokinetics studies of ivermectin effect of formulation. *Vet Res Commun* 1985; 9:251-268.
19. Nakamura K. Potential use of cyclodextrins to enhance the solubility of YM466 in aqueous solution. *Drug Dev Ind Pharm* 2003; 29:903-908.
20. Pitha J, Milecki J, Fales H, Pannell, Uekama K. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin: preparation and characterization; effects on solubility of drugs. *Int J Pharm* 1986; 29:73-82.
21. Raghavan R, Joseph JC. Chromatographic methods of analysis-High-Performance Liquid Chromatography. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 2002; 414-425.
22. Rivera FN, Ibarra VF, Olazarán JS, Vera MY, Castillo BR, Hernández CA. Eficacia del 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy) benzimidazole contra diversas edades de *Fasciola hepatica* en ovinos. *Vet Méx* 2002; 33:55-61.
23. Rong-Kun Ch, Amir HS. Effect of Hydroxypropyl B-cyclodextrin on drug solubility in water-propylene glycol mixtures. *Drug Develop and Indus Pharm* 2004; 30 (3):297-302.
24. Sanderson DM. A note on glycerol formal as a solvent in toxicity testing. *J Pharm Pharmacol* 1959; 11:150-156.
25. Simamora P, Alvarez JM, Yalkowsky SH. Solubilization of rapamycin. *Inter J of Pharm* 2001; 213:25-29.

26. Waleczek KJ, Cabral MHM, Hempel B, Schmidt PC. Phase solubility studies of pure (-) alga-bisabolol and chamomile essential oil beta-cyclodextrin. *Eur J Pharm Biopharm* 2003; 55:247-251.
27. Wicks S, Kaye B, Weatherley A, Lewis D, Davison E, Gibson S, Smith D. Effect formulation the pharmacokinetics and efficacy of doramectin. *Vet Parasitol* 1993; 49: 17-26.
28. Zingone G, Rúbessa F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin-beta-cyclodextrin. *Int J Pharm* 2005; 291:3-10.

Cuadro 1. Porcentajes de solubilidad del compuesto Alfa utilizando diferentes vehículos

Compuesto Alfa	Vehículo	Porcentaje de solubilidad*
2 mg	Agua	LDD
2 mg	Alfa ciclodextrina con agua	0
2 mg	Hidroxi propil alfa ciclodextrina con agua	0
2 mg	Beta ciclodextrina con agua	0.051
2 mg	Hidroxi propil beta ciclodextrina con agua	1.018
2 mg	Hidroxi propil beta ciclodextrina con agua	3.95
2mg	Hidroxi propil beta ciclodextrina con metanol más agua	10.76
2mg	Propilén glicol con agua	39.048
2mg	Glicerol formal con agua	100
2 mg	Glicerol formal con propilén glicol y agua/ 3:2:5 ml	100
2 mg	Glicerol formal con propilén glicol y agua/ 3:2:4 ml	100

* Determinado por el cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

LDD= Límite de detección. No se detecta a una concentración menor de 50 ng/ml.

Figura 1. Determinación de la presencia del compuesto Alfa y alfa ciclodextrina por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución

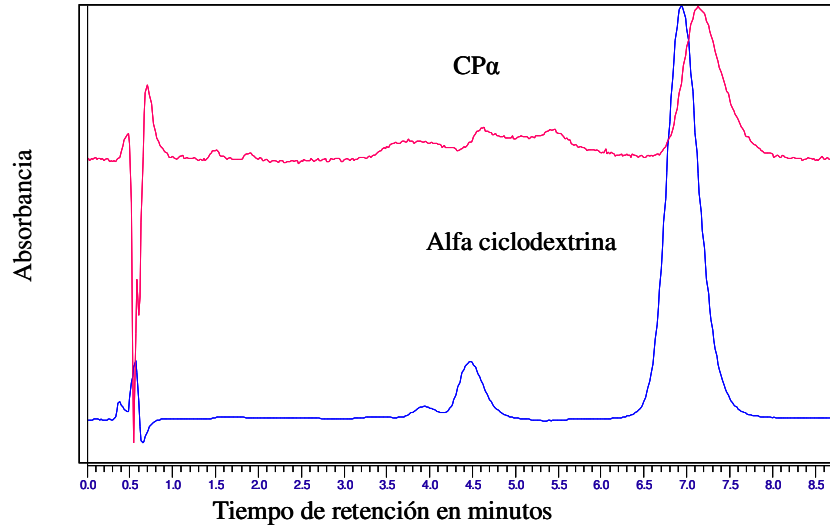


Figura 2. Determinación de la presencia del compuesto Alfa y beta ciclodextrina por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución

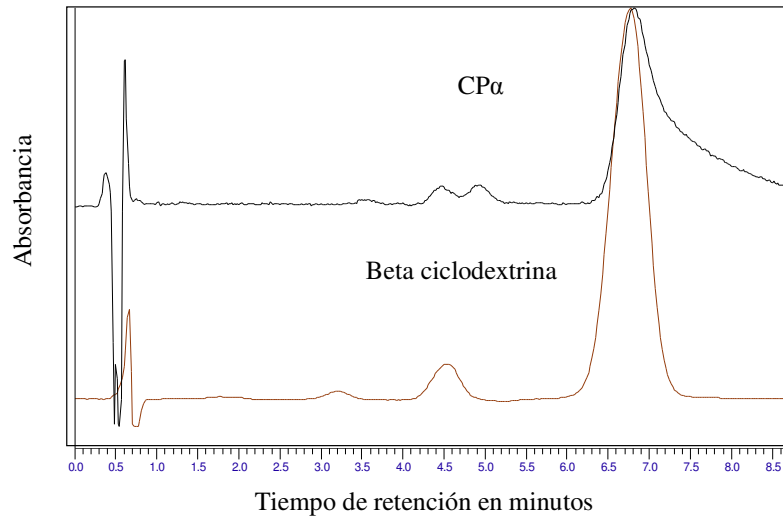


Figura 3. Determinación de la presencia del compuesto Alfa e hidroxil propil alfa ciclodextrina por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución

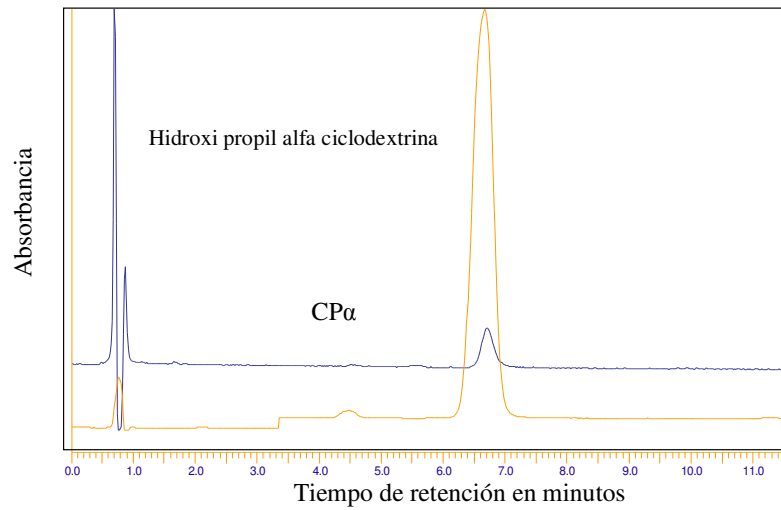


Figura 4. Determinación de la presencia del compuesto Alfa e hidroxil propil beta ciclodextrina por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución

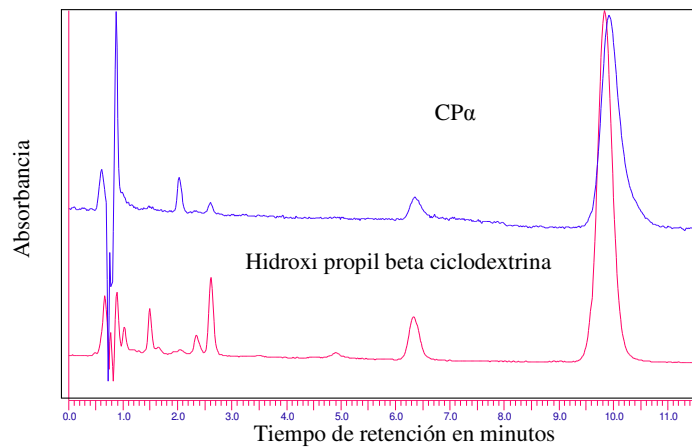


Figura 5. Determinación de la presencia de los estándares del compuesto Alfa por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución

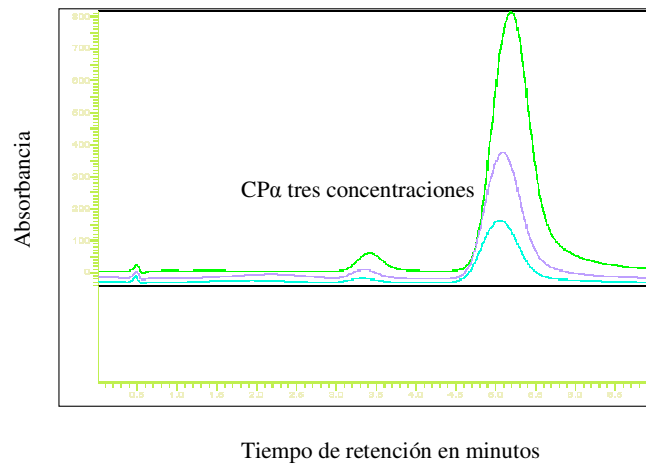


Figura 6. Detección del compuesto Alfa solubilizado con HPβCD por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución

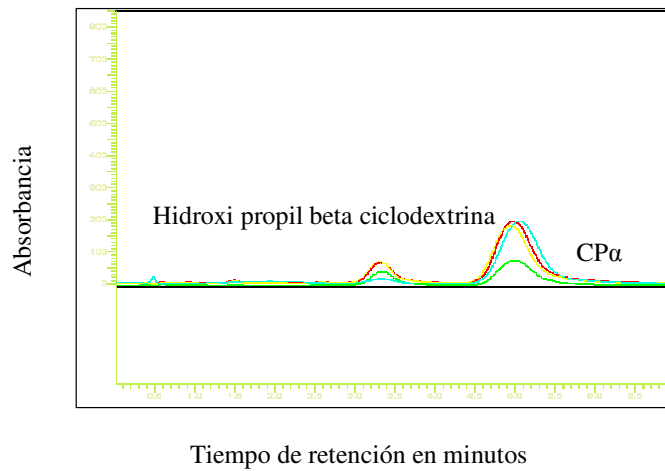


Figura 7. Detección del compuesto Alfa solubilizado con propilén glicol por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución

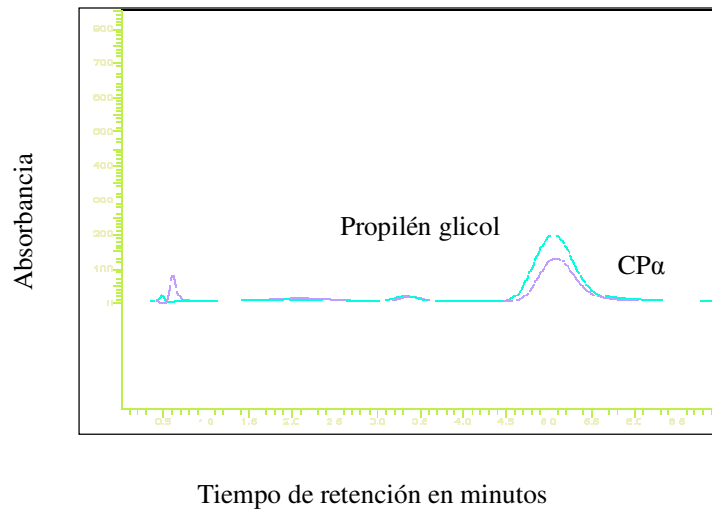
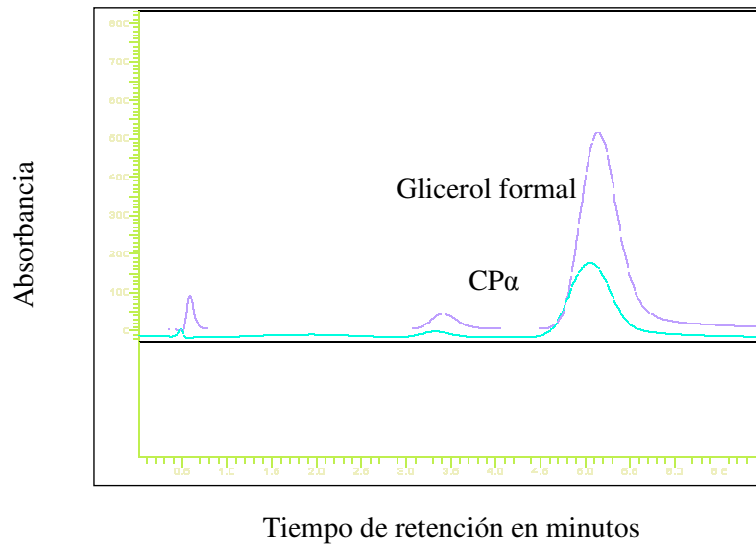


Figura 8. Detección del compuesto Alfa solubilizado con glicerol formal por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución



III. EXPERIMENTO 2. EFICACIA *IN VITRO* DEL COMPUESTO ALFA SOLUBILIZADO CONTRA FASCIOLAS INMADURAS

III.1. Resumen

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia fasciolicida *in vitro* del compuesto Alfa solubilizado con HP- β -CD, propilén glicol, glicerolformal y la combinación de glicerolformal con propilén glicol y agua en proporciones 3:2:4 y 3:2:5. Para lo cual se realizó la técnica de desenquistamiento artificial de metacercarias de *Fasciola hepatica* a fin de realizar la evaluación bajo condiciones *in vitro*.

Los resultados muestran que el CP α solubilizado con HP- β -CD en 96 horas no eliminó las fasciolas; con el uso del glicerolformal y la combinación glicerolformal con propilén glicol y agua se tuvo una eficacia fasciolicida del 100 % a las 24 horas. Por otro lado todos los controles se mantuvieron vivos durante 96 horas.

Se concluye que el compuesto Alfa solubilizado con glicerolformal y la combinación glicerolformal con propilén glicol y agua tiene alta eficacia fasciolicida *in vitro*.

Palabras clave: *Fasciola hepatica*, vehículos, eficacia, *in vitro*, compuesto Alfa.

III.2. Introducción

El compuesto Alfa o 5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (Hernández *et al.*, 2002), ha mostrado alta eficacia fasciolicida *in vitro* (Ibarra *et al.*, 1997b; Rivera *et al.*, 2002). Sin embargo su solubilidad es muy pobre en agua, por lo cual se realizaron ensayos donde se logro solubilizarlo, como seguimiento al proceso de formulación es importante evaluar su eficacia fasciolicida *in vitro* antes de evaluar su inocuidad en el músculo donde se aplica.

El objetivo del estudio fue determinar la eficacia contra fasciolas inmaduras *in vitro* del CP α solubilizado.

III.3. Material y métodos

Preparación de compuestos para evaluación quimioterapéutica.- Se utilizaron 0.5 mg/ml de CP α solubilizado con HP- β -CD y 5 mg/ml de CP α con GF, PG y la combinación de GF con PG y H₂O (3:2:4 y 3:2:5) que se depositaron en viales de 30 ml de capacidad. Posteriormente se prepararon las diluciones correspondientes con la finalidad de obtener las concentraciones requeridas para la evaluación biológica contra *Fasciola hepatica*.

Condiciones cromatográficas.- Se utilizó un sistema cromatográfico con bomba binaria, automuestreador y detector de arreglo de diodos, a una longitud de onda de 304 nm. La fase móvil consistió en metanol, agua y acetonitrilo (40:40:20 v/v/v) en grado CLAR, degasificador en línea con helio. La fase estacionaria consistió en una columna C18 de 80 mm de longitud. La suspensión a evaluar se filtró con membrana 0.45- μ m (Millex-LCR syringe driven filter units Millipore), se inyectaron 25 microlitos de muestra, el flujo isocrático de 1.5 ml/min. El tiempo de corrida fue de 8 minutos, el tiempo de retención para el CP α fue de 1.5 minutos. Los límites de cuantificación fueron establecidos midiendo la mas baja concentración con un porcentaje de recuperación de 82.26, coeficiente de variación (CV) 4.5 %, coeficiente de correlación de 0.99, desviación estándar de 3.70 y variación entre ensayos o interlaboratorios de 8.683. El límite de detección del equipo para el CP α solubilizado con los diferentes vehículos fue de 50 ng/ml.

Metacercarias.- Las metacercarias de *Fasciola hepatica* fueron producidas en caracoles *Lymnaea humilis* a partir de la infección con miracidios de origen bovino obtenidos de un rastro local.

Técnica de desenquistamiento.- Se realizó la técnica de desenquistamiento artificial como se describe por Rivera *et al.*, (2005).

Operación de ensayo para escrutinio.- Se utilizaron cajas de cultivo de 24 pozos marca Nunc. Por cada pozo se depositaron 1.6 ml de medio completo, 0.2 ml del compuesto solubilizado y 0.2 ml conteniendo 10 fasciolas por pozo. Los compuestos se probaron a concentraciones terciadas de 50, 10 y 0.5 mg/ml. Cada compuesto se evaluó por duplicado y se contó por lo menos con 8 pozos como testigo conteniendo únicamente fasciolas. Cada ensayo se mantuvo un período de incubación por 4 días a 37° C con una atmósfera de CO₂ al 5 %. Este procedimiento fue realizado de acuerdo a lo descrito por Ibarra y Jenkins, (1984) y modificado por Rivera *et al.*, (2004).

Interpretación de la prueba.- Las fasciolas fueron examinadas cuidadosamente en los días 0, 1 y 4, utilizando microscopio invertido a 40X. La actividad de los compuestos fue medida por comparación de la sobrevivencia de las fasciolas bajo tratamiento con relación a las fasciolas controles no tratados. La mortalidad se determinó al observar la cutícula intacta sin movimientos externos e internos y ruptura de la cutícula de la adoloscercaria debido a que el CP α ejerce un efecto importante sobre el tegumento de la *Fasciola hepatica* (Rivera *et al.*, 2004). Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en condiciones asépticas utilizando una campana de flujo laminar.

Análisis estadístico.- Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza para determinar diferencias de eficacia entre concentraciones y grupos de los compuestos evaluados. Se utilizó la prueba de Nemenyi (1995) apoyado con el uso del paquete estadístico SAS (Linares, 1990).

III.4. Resultados

En el cuadro 2 se observa que el CP α solubilizado con HP- β -CD y propilén glicol en 96 horas no eliminó las fasciolas, con GF y la combinación GF con PG y H₂O en ambas concentraciones tuvo una eficacia fasciolicida del 100 % a las 24 horas. Por otro lado todos los controles se mantuvieron vivos durante 96 horas.

III.5. Discusión

Estudios previos muestran que el compuesto Alfa tiene alta eficacia *in vitro* contra *F. hepatica* inmadura (Ibarra *et al.*, 1996; Ibarra *et al.*, 1997b; Rivera *et al.*, 2002), por lo cual el CP α solubilizado con los vehículos no afecta su eficacia fasciolicida que fue del 100 %.

La baja eficacia del CP α solubilizado con HP- β -CD es debido a la baja concentración de la formulación y con el uso del propilén glicol a pesar de tener mejor concentración debido a sus características de viscosidad es probable que afectara la eficacia del CP α . Como siguiente etapa en la evaluación de la formulación desarrollada es necesario evaluar el posible daño muscular cuando es administrado.

III.6. Conclusión

El compuesto Alfa solubilizado con la combinación de glicerolformal con propilén glicol y agua tiene alta eficacia contra *Fasciola hepatica in vitro*.

III.7. Referencias

1. Hernández CA, Ibarra VF, Vera MY, Rivera FN, Castillo BR. Synthesis and Fasciolicidal Activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1H-benzimidazole. Chem Pharm Bull 2002; 50:649-652.
2. Ibarra VF, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia fasciolicida del compuesto "Alfa" contra estadios juveniles y adultos en ovinos. Vet Méx 1997b; 28:297-301.
3. Ibarra QF, Jenkins DC. An *in vitro* screen for new fasciolicidal agents. Z Parasitenkd 1984; 70:655-661.
4. Ibarra VF, Montenegro CN, Flores CJ, Hernández CA, Castillo BR. Evaluación de 4 vehículos para formular un fasciolicida experimental. Vet Méx 2000b; 31:47-51.
5. Linares G (1990) Análisis de Datos. UH.
6. Lo P, Fink D, Williams J, Blodinger J. Pharmacokinetics studies of ivermectin effect of formulation. Vet Res Commun 1985; 9:251-268.
7. Rivera N, Ibarra F, Zepeda A, Fortoul T, Hernández A, Castillo R. Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment *in vitro* and *in vivo* with an experimental fasciolicide. Parasitol Res 2004; 93:283-286.
8. Rivera N, Ibarra F, Zepeda A, Fortoul T, Cantó G, Hernández A, Castillo R. The effect of the 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy)-1H-benzimidazole called compound alpha on the tegument of immature *Fasciola hepatica* in its natural host. Parasitol Res 2005; 95:379-382.
9. Rivera FN, Ibarra VF, Olazarán JS, Vera MY, Castillo BR, Hernández CA. Eficacia del 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthoxy) benzimidazole contra diversas edades de *Fasciola hepatica* en ovinos. Vet Méx 2002; 33:55-61.

Cuadro 2. Eficacia fasciolicida *in vitro* del compuesto Alfa solubilizado con diferentes vehículos

Compuesto/Vehículo	Dosis mg/L			
	10		50	
	Eficacia %		Eficacia %	
	24 horas	96 horas	24 horas	96 horas
CPα con Hidroxipropil-Beta-Ciclodextrina / 0.5 mg/L	60	60	60	60
CPα con PG	50	60	50	60
CPα con PG	30	40	30	40
CPα con GF	100	100	100	100
CPα con GF	100	100	100	100
CPα combinado con GF, PG y H2O / 3:2:5	100	100	100	100
CPα combinado con GF, PG y H2O / 3:2:5	100	100	100	100
CPα combinado con GF, PG y H2O / 3:2:4	100	100	100	100
CPα combinado con GF, PG y H2O / 3:2:4	100	100	100	100
Triclabendazol con GF	100	100	100	100
GF con H2O / 2 ml	0	0	0	0
PG con H2O / 2 ml	0	0	0	0
Hidroxipropil-Beta-Ciclodextrina/ 5.6 mg/L con H2O/ 2 ml	0	0	0	0
RPMI medio / 1.6 ml	0	0	0	0

CPα = Compuesto Alfa. PG = Propilenglicol. RPMI = Medio de cultivo.

GF = Glicerolformal. H2O = Agua.

IV. EXPERIMENTO 3. CAMBIOS HISTOPATOLÓGICOS EN EL MÚSCULO ESQUELÉTICO DE RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE UN FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL

IV.1. Resumen

El compuesto Alfa (CP α) fue solubilizado y evaluado *in vitro* con una eficacia del 100 % contra fasciolas inmaduras; como parte de los protocolos de validación de nuevas formulaciones es necesario determinar el daño en su aplicación intramuscular. Para lo cual se formaron 10 grupos con 7 ratones machos CD-1 cada uno, a los cuales se les administró el CP α solubilizado con diferentes vehículos a una dosis de 1 y 2 mg/kg y se evaluó el daño muscular por medio de histopatología. Los resultados muestran que al aplicar el glicerolformal e hidroxipropil-beta-ciclodextrina, se presentaron diferentes grados de daño muscular como la mionecrosis supurativa multifocal de discreta a grave; con el uso de la combinación del glicerolformal con propilenglicol y agua, propilenglicol y agua como control no se presentó daño muscular.

El uso del CP α solubilizado con la combinación de glicerolformal con propilenglicol y agua, no causa daño muscular y será utilizado en otras pruebas que permitan una administración intramuscular inocua en rumiantes.

Palabras clave: Compuesto Alfa, lesiones, vehículos, intramuscular, solubilidad.

IV.2. Introducción

El compuesto Alfa por su naturaleza estructural, no es soluble en agua lo que ha imposibilitado su administración por vía intramuscular, en ensayos previos se solubilizó el CP α con diferentes vehículos en 100 % y se cuantificó la solubilidad por medio de la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), asimismo el compuesto solubilizado mostró una excelente eficacia fasciolicida *in vitro*. Como parte del desarrollo de nuevas formulaciones se requiere de un proceso crítico, donde los compuestos y vehículos utilizados sean bien tolerados e inocuos, para evitar el daño después de su aplicación intramuscular.

La aplicación de compuestos por vía intramuscular es común e inocua pero en algunas ocasiones se puede encontrar daño a los tejidos, se ha reportado que las formulaciones inducen daños en el músculo después de su aplicación intramuscular, las cuales pueden

ser producidas por el compuesto, el vehículo y la combinación de ellos (Dickson *et al.*, 1986; Svendsen, 1988).

Se debe considerar que no hay una forma de predecir el daño local o la tolerancia a una nueva formulación y sus componentes; las formas más comunes de realizar la evaluación son por inducción de daño en los músculos y su revisión por histopatología, y por medición bioquímica de la creatinina quinasa (Sidell *et al.*, 1974; Aktas *et al.*, 1995a; Ferré *et al.*, 2001).

La evaluación del daño en músculos después de la aplicación de un compuesto en distintas especies domésticas se ha utilizado en oxitetraciclina, cloranfenicol, penicilina G, vitaminas y fenilbutazona entre otros compuestos químicos (Dickson *et al.*, 1986; Lutman *et al.*, 1988; Dagorn *et al.*, 1990; Nouws *et al.*, 1990; Houpert *et al.*, 1995). Por lo cual es necesario evaluar el CP α solubilizado después de su administración por vía intramuscular y evaluar su posible daño en el músculo aplicado.

Las etapas de la reacción del músculo en secuencia que es lesionado por una formulación administrada son: a). Reacción inflamatoria aguda, que puede durar minutos o días con presencia de exudado de proteínas plasmáticas, migración de leucocitos y neutrófilos. b). Inflamación crónica donde se presentan macrófagos, linfocitos monocitos y la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo. c). Tejido de granulación o etapa de regeneración en la cual hay macrófagos, fibroblastos y capilares, los cuales reparan el daño ocasionado. d). Reacción de células foráneas con presencia de macrófagos y células gigantes. e). Fibrosis como respuesta final al área lesionada (Anderson, 1994).

El objetivo del estudio fue administrar el CP α solubilizado a ratones por vía intramuscular y evaluar el daño por histopatología. En caso de resultar exitoso, se podrán sentar las bases para elaborar una formulación inyectable para uso veterinario en rumiantes.

IV.3. Material y métodos

Compuesto Alfa.- El compuesto Alfa (5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol) fue sintetizado en el departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (Hernández *et al.*, 2002).

Vehículos.- El glicerolformal (GF) ($C_4H_8O_3$) es una mezcla de 5-hidroxi-1,3-dioxane y 4-hidroximetil-1,3-dioxolane (60:40), la hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- β -CD) y el propilén glicol (PG), todos los vehículos fueron obtenidos de una fuente comercial (Sigma-Aldrich. USA).

Animales.- Se utilizaron 70 ratones machos cepa CD-1 de 30-40 g (6-8 semanas de edad), clínicamente sanos, los cuales tuvieron una semana de adaptación en condiciones de ambiente convencional como lo indica la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999. *Conducción del experimento.*- Se dividieron en 10 grupos de 7 animales cada uno, previo dietado de 12 horas se siguió el procedimiento de inyección del compuesto solubilizado descrito en el cuadro 3.

La dosis del compuesto se inyectó en la línea media (1.5 cm) en un plano vertical lo más centrado posible (Svendsen *et al.*, 2005). El grosor del músculo en el sitio de inyección fue evaluado después de la aplicación por palpación.

Los animales se identificaron por grupo por tarjeta y en forma individual, por medio de un tatuaje en la oreja cuando fue necesario y se identificó el sitio de punción de la aguja con anilina (Ping y Hayes, 1994).

Disposición de los cadáveres.- Al concluir el estudio, la disposición de los cadáveres y muestras de tejidos se realizó conforme a las normas NOM-087-ECOL-1995 y NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

Solubilidad del compuesto Alfa.- La formación de complejos de inclusión del compuesto Alfa con HP- β -CD en agua (H_2O), se realizó conforme al procedimiento descrito por Evard *et al.*, (2002) y Zingone y Rubessa, (2005).

Para solubilizar el CP α con GF se usaron 0.5 ml de glicerolformal, 9.5 ml de agua y 40 mg de CP α para una dosis de 1 mg/kg se utilizaron 0.125 ml y para 2 mg/kg fue de 0.25 ml de la solución. Para la HP- β -CD se utilizaron 5.8 mg con 20 mg de CP α y en la combinación de vehículos de glicerolformal con propilén glicol y agua en proporciones de 3:2:4 y 3:2:5 con 2 mg de CP α .

Condiciones cromatográficas.- Se utilizó un sistema cromatográfico con bomba binaria, automuestreador y detector de arreglo de diodos, a una longitud de onda de 304 nm. La fase móvil consistió en metanol, agua y acetonitrilo (40:40:20 v/v/v) en grado CLAR, desgasificador en línea con helio. La fase estacionaria consistió en una columna C18 de 80 mm de longitud. La suspensión a evaluar se filtró con membrana 0.45- μ m (Millex-LCR syringe driven filter units Millipore), se inyectaron 25 microlitos de muestra, el flujo isocrático de 1.5 ml/min. El tiempo de corrida fue de 8 minutos, el tiempo de

retención para el CP α fue de 1.5 minutos. Los límites de cuantificación fueron establecidos midiendo la mas baja concentración con un porcentaje de recuperación de 82.26, coeficiente de variación (CV) 4.5 %, coeficiente de correlación de 0.99, desviación estándar de 3.70 y variación entre ensayos o interlaboratorios de 8.683. El límite de detección del equipo para el CP α solubilizado con los diferentes vehículos fue de 50 ng/ml.

Para el cálculo de la concentración del compuesto se empleo un estándar externo, con el método de adicción se determinó el porcentaje de recuperación de la técnica analítica para establecer el porcentaje de recuperación del compuesto durante la extracción (Del Rivero *et al.*, 1998).

Muestras de tejidos.- El día 0 y después de la aplicación del compuesto se procedió a realizar la eutanasia (NOM-062-ZOO-1999) de los animales a las 0, 12, 24, 48, 72, 96 y 102 horas, la verificación de la muerte del animal fue determinado por detección del latido cardíaco y la revisión de las pupilas (León y Villegas, 2004), después se realizó la necropsia de cada ejemplar y se tomó muestra de músculo esquelético de 1 a 0.5 cm² del área de inyección del CP α solubilizado (Hayes *et al.*, 1973a; Corba *et al.*, 1981; Babicek y Danek, 1989; Svendsen *et al.*, 2005), los cuales se fijaron en formalina amortiguada al 10% con pH 7.2. Para realizar cortes histológicos, procesados por la técnica de parafina y teñidos con hematoxilina eosina, para su revisión bajo el microscopio compuesto para determinar el daño muscular por medio de la presencia de lesiones en las fibras musculares como la mionecrosis, hiperconcentración de las fibras, reacción inflamatoria, fibroblastos, tejido de granulación, colágeno, vacuolas intracelulares e infiltración celular entre otras variables de reacción local a una inyección intramuscular.

Análisis estadístico

La relación entre las áreas sanas y las enfermas con necrosis fueron analizadas por medio de ANOVA y la comparación múltiple de Tukey. Los niveles de significancia se aceptaron debajo de 5 % (SAS versión 8.2).

IV.4. Resultados

A la observación clínica los animales inyectados con HP- β -CD, PG, CP α con H₂O y el control de agua en todos los casos se observaron ligeros y breves temores musculares. Cuando se inyectó el CP α con la combinación de vehículos se observaron moderados temores musculares y con el uso del glicerolformal se observaron fuertes temores musculares, esta reacción en todos los casos solo se manifestó durante la inyección

intramuscular. Estos tremores se pueden deber a las contracciones del músculo debido a la irritación natural de la formulación del compuesto y el factor mecánico de la aguja. A la palpación del área del músculo donde se inyectó no se detectaron cambios de tamaño y después no se observaron otros signos clínicos, todos los grupos se comportaron en forma social y de alimentación en forma normal.

En el cuadro 3 se muestran los hallazgos después de la revisión histopatológica.

El grupo 1 con CP α solubilizado con GF, se encontró mionecrosis supurativa multifocal de discreta a grave.

El grupo 2 con CP α solubilizado con GF, se observó mionecrosis supurativa multifocal discreta y presencia de células inflamatorias (neutrófilos).

El grupo 3 con CP α solubilizado con HP- β -CD, se encontró mionecrosis supurativa focal discreta y en la mayoría de los tiempos no se encontraron cambios histopatológicos aparentes.

En los grupos 4, 5, 9 y 10 no se encontraron cambios histopatológicos aparentes.

El grupo 6 con GF y H₂O, se encontró mionecrosis supurativa multifocal de discreta a moderada.

El grupo 7 con PG con agua, se encontró miositis multifocal moderada con macrófagos en la lectura de 12 horas, en las demás lecturas no se encontraron cambios histopatológicos aparentes.

El grupo 8 con una dosis de 0.2 ml e HP- β -CD con 5.8 mg se observó mionecrosis supurativa multifocal moderada a las 12 y 48 horas en las otras lecturas no se encontraron cambios histopatológicos aparentes.

Se encontró diferencia estadística significativa entre las muestras de músculo del grupo control y de tratamiento, así como se encontró diferencias entre tratamientos ($P < 0.05$).

IV.5. Discusión

En los grupos 1, 2, 3, 6 y 7 se encontraron diferentes grados de lesión, la extensión del músculo dañado lo cual puede deberse a la concentración del compuesto, los vehículos utilizados y el volumen inyectado (Ferré *et al.*, 2006). Se conoce que a mayor volumen inyectado o concentración del compuesto mayor será el daño local ocasionado en conejos y cerdos (Diness *et al.*, 1985; Nouws, 1984). Así mismo a mayor daño muscular se puede afectar la biodisponibilidad del compuesto (Sidell *et al.*, 1974) y encontrar animales con irritación muscular severa (Nouws, 1984; Diness, 1985). El compuesto

también por sí mismo puede ser muy irritante, se reporta que cerca del 70 % de 107 diferentes formulaciones presentaron propiedades citotóxicas (Oshida *et al.*, 1979).

En este trabajo el principal daño se encontró con el uso de GF con CP α y su control; el volumen inyectado no tuvo efecto en el daño, como lo confirma un estudio donde se demuestra que la biodisponibilidad del compuesto y daño en el músculo, no se ve influenciado por el volumen inyectado (Ferré *et al.*, 2006). El daño también puede deberse a la viscosidad de la formulación, sin embargo los vehículos oleosos son mejor tolerados que los acuosos (Dickson *et al.*, 1986; Svendsen, 1988), por lo cual el GF por sus características fisicoquímicas las moléculas de formaldehído son muy irritantes y son la principal causa de la reacción y daño al músculo.

El CP α solubilizado con los vehículos de GF con PG y H₂O, no daño en el músculo donde se aplicó, debido a la proporción de vehículos utilizados, se debe considerar que la tolerancia a la sustancia activa o vehículo utilizado, se puede encontrar extrema variabilidad individual en el daño muscular como sucedió en la lectura de algunos tiempos y compuestos utilizados. Por lo cual los resultados obtenidos, no deben ser extrapolados a otros compuestos formulados debido a las diferencias propias del compuesto y de los vehículos utilizados.

El compuesto Alfa solubilizado con los vehículos de GF con PG y H₂O e inyectado en ratones fue inocuo por lo cual la formulación es una alternativa viable para su administración intramuscular en animales para consumo.

IV.6. Conclusión

El compuesto Alfa solubilizado con la combinación de vehículos y administrado por vía intramuscular no lesionó el músculo de ratones.

IV.7. Referencias

1. Aktas M, Lefebvre HP, Toutain PL, Braun JP. Disposition of creatine kinase activity in dog plasma following intravenous and intramuscular injection of skeletal muscle homogenates. *J Vet Pharm Ther* 1995a; 18:1-6.
2. Anderson JM. In vivo biocompatibility of implantable delivery systems and biomaterials. *Eur J Biopharm* 1994; 40: 1-8.
3. Babicek K, Danek J. Checking the method of testing antifasciolles on the model helminth *Fasciola hepatica* in experimentally invaded laboratory rats. *Biol Chem Vet (Praha)* 1989; 25:311-320.

4. Corba J, Velebny S, Spaldonova R. Primary screening of newly synthesized substances in white mice invaded with *Fasciola hepatica*. *Helminthology* 1981; 18: 43-52.
5. Dagorn M, Guillot P, Sander P. Pharmacokinetics of cloramphenicol in sheep after intravenous, intramuscular and subcutaneous administration. *Vet Q* 1990; 12:166-174.
6. Del Rivero LM, Jung H, Castillo R, Hernández CA. High-performance liquid chromatographic assay for a new fasciolicide agent, α BIOF10, in biological fluids. *J Chrom B* 1998; 72:237-241.
7. Dickson J, Hopkins DL, Doncon GH. Muscle damage associated with injection of vitamin E in sheep. *Aust Vet J* 1986; 63:231-233.
8. Diness V. Local tissue damage after intramuscular injections in rabbits and pigs. Quantification by determination of creatine kinase activity at injection sites. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1985; 56:410-415.
9. Ferré PJ, Condordet D, Laroute V, Chanoit GP, Ferre JP, Manesse M, Lefebvre HP. Comparison of ultrasonography and pharmacokinetic analysis of creatine kinase release for quantitative assessment of postinjection muscle damage in sheep. *Am J Vet Res* 2001; 62:1698-1705.
10. Ferré PJ, Laroute V, Braun JP, Cazaux J, Toutain PL, Lefebvre H.P. Simultaneous and minimally invasive assessment of muscle tolerance and bioavailability of different volumes of an intramuscular formulation in the same animals. *J Anim Sci* 2006; 84:1295-1301.
11. Houpert P, Serthelon JP, Lefebvre HP, Toutain PL, Braun JP. *In vivo* non-invasive quantification of muscle damage following a single intramuscular injection of phenylbutazone in sheep. *Vet Hum Toxicol* 1995; 37:105-110.
12. Hayes TJ, Bailer J, Mitrovic M. The pattern of mortality in mice experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Int J Parasit* 1973a; 3:665-669.
13. Hernández CA, Ibarra VF, Vera MY, Rivera FN, Castillo BR. Synthesis and Fasciolicidal Activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)-1Hbenzimidazole. *Chem Pharm Bull* 2002; 50(5):649-652.
14. León MB, Villegas AF. Manual de manejo y anestesia en el conejo como modelo quirúrgico en docencia. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. 2004.

15. Luthman J, Dall V, Jacobsson SO, Bengtsson B, Korpe C. Influence of the local tolerance on the pharmacokinetics of two penicillin G preparations in cattle and swine. *Acta Vet Scand* 1988; 29:199-206.
16. Nouws JF. Irritation, bioavailability and residue aspects of ten oxytetracycline formulations administered intramuscularly to pigs. *Vet Q* 1984; 6:80-84.
17. Nouws JF, Smulders A, Rappalini M. A comparative study on irritation and residue aspects of five oxytetracycline formulations administered intramuscularly to calves, pigs and sheep. *Vet Q* 1990; 12:129-138.
18. Oshida S, Degawa K, Takahashi Y, Akaishi S. Physicochemical properties and local toxic effects of injectables. *Tohoku J Exp Med* 1979; 127:301-316.
19. Ping C, Hayes A. Acute toxicity and eyes irritancy. In: *Principles and Methods of Toxicology, Third Edition*, Edited by A. Wallace Hayes, Raven Press Ltd, New York. 1994.
20. Sidell FR, Culver DL, Kaminskis A. Serum creatine phosphokinase activity after intramuscular injection. The effect of dose, concentration and volume. *JAMA*. 1974; 229:1894-1897.
21. Svendsen O. Studies of tissue injuries caused by intramuscular injection of drugs and vehicles. Methods for quantification and effects of concentration, volume, vehicle, injection speed and intralipomatous injection. D.Sc. Thesis. Medical Faculty, University of Copenhagen, 1988.
22. Svendsen O, Edwards N, Lauritzen B, Rasmussen A. Intramuscular injection of hypertonic saline: In vitro and in vivo muscle tissue toxicity and spinal neurone c-fos expression. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 97:52-57.
23. Vera MY, Ibarra VF, Liébano HE, Quiroz RH, Castillo BR, Hernández CA, Ochoa GP. Efficacy of an experimental fasciolicide against immature and mature *Fasciola hepatica* in artificially infected calves. *Parasitol Res* 2004; 92:211-214.
24. Zingone G, Rubessa F. Preformulation study of the inclusion complex warfarin-beta-cyclodextrin. *Int J Pharm* 2005; 291:3-10.

Cuadro 3. Histopatología de músculo esquelético de ratones inyectados con CPα solubilizado							
Hora	0	12	24	48	72	96	102
Grupo 1 CPα + GF 2 mg	Miositis necrótica multifocal con escasos neutrófilos	Mionecrosis multifocal discreta. Focos inflamatorios constituidos por neutrófilos por efecto mecánico y en proceso agudo.	Miositis necrótica multifocal discreta acompañada de presencia de neutrófilos y macrófagos.	Mionecrosis multifocal discreta. Focos inflamatorios constituidos por macrófago por efecto mecánico y en proceso crónico.	Mionecrosis supurativa multifocal grave	Mionecrosis supurativa multifocal discreta	Miositis necrótica y supurativa discreta focal, acompañada de discreta cantidad de neutrófilos.
Grupo 2 CPα + GF 1 mg	Hemorragia por inyección	Células inflamatorias mionecrosis, con presencia de necrosis. Presencia de células cebadas en dermis.	Mionecrosis supurativa multifocal discreta. Hemorragia en fibras musculares.	SCHPA	Mionecrosis supurativa multifocal discreta	Mionecrosis supurativa multifocal discreta	SCHPA
Grupo 3 CPα + HP-β- CD	Focos constituidos de células cebadas.	Mionecrosis supurativa multifocal grave	Mionecrosis supurativa multifocal grave. Discretos focos de hemorragia entre las fibras musculares.	Mionecrosis supurativa multifocal discreta	Mionecrosis supurativa multifocal discreta. Dermatitis supurativa moderada, difusa y presencia de edema de la sustancia propia.	Mionecrosis supurativa multifocal moderada	SCHPA
Grupo 4 CPα+GF+P G+H2O (3:2:5)	SCHPA	SCHPA	SCHPA	SCHPA	SCHPA	SCHPA	SCHPA
Grupo 5 CPα+GF+P G+H2O (3:2:4)	SCHPA	SCHPA	Las fibras musculares.	Presencia de células inflamatorias en forma discreta con macrófagos y neutrófilos en tejido adiposo. Las células se extienden a algunas fibras musculares	SCHPA	SCHPA	Hemorragia multifocal discreta entre las fibras musculares.
Grupo 6 GF + H2O	Focos constituidos de células cebadas	Miositis necrótica multifocal moderada, acompañada de neutrófilos y macrófagos	SCHPA	Mionecrosis supurativa multifocal discreta	Mionecrosis supurativa multifocal discreta	Mionecrosis supurativa multifocal moderada	Mionecrosis supurativa multifocal discreta
Grupo 7 PG + H2O	SCHPA	SCHPA	SCHPA	Miositis y mionecrosis multifocal moderada con macrófagos.	SCHPA	SCHPA	SCHPA
Grupo 8 HP-β-CD + H2O 5.6 mg	SCHPA	Mionecrosis supurativa multifocal moderada	Mionecrosis supurativa multifocal discreta	SCHPA	Mionecrosis supurativa multifocal discreta	Mionecrosis supurativa multifocal moderada	Mionecrosis supurativa multifocal discreta
Grupo 9 CPα + H2O	SCHPA	SCHPA	SCHPA	SCHPA	Mionecrosis supurativa focal discreta	SCHPA	SCHPA
Grupo 10 Agua (H2O)	SCHPA	SCHPA	SCHPA	SCHPA	SCHPA	SCHPA	SCHPA
SCHPA = Sin cambios histopatológicos aparentes							

V. EXPERIMENTO 4. EFICACIA Y CINÉTICA DEL COMPUESTO ALFA SOLUBILIZADO EN CONEJOS INFECTADOS ARTIFICIALMENTE CON *Fasciola hepatica*

V.1. Resumen

Como parte de la evaluación de nuevos compuestos se requiere realizar estudios de farmacocinética y de eficacia contra *Fasciola hepatica* los cuales son esenciales para determinar su potencial terapéutico y la cinética del compuesto por vía intramuscular. El objetivo del trabajo consistió en evaluar la eficacia y cinética del CP α solubilizado aplicado por vía intramuscular en conejos Nueva Zelanda Blancos infectados con 90 metacercarias de *Fasciola hepatica*. Después de determinar la infección por coprología se dividieron en 4 grupos de 6 animales cada uno y se les administró una dosis de 1, 2 mg/kg, el tercer grupo recibió 4 mg/kg, no estaban infectados con el trematodo y el cuarto grupo fue de control.

Los resultados muestran que a una dosis de 1mg/kg tuvo una eficacia de 16.7 % y a 2 mg/kg de 68.4 %, la farmacocinética mostró que el CP α y sus metabolitos sulfóxido y sulfona no se encontraron en plasma, determinado por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

Se concluye que el CP α administrado por vía intramuscular en conejos tuvo insuficiente eficacia contra *Fasciola hepatica*.

Palabras clave: Compuesto Alfa, solubilidad, intramuscular, vehículos, *Fasciola hepatica*.

V.2. Introducción

El compuesto Alfa en ensayos previos se solubilizó con la combinación de glicerolformal (GF) con propilénglicol (PG) y agua (H₂O) al 100 % en proporción 3:2:4, en la prueba *in vitro* fue 100 % eficaz contra *Fasciola hepatica* inmadura. Actualmente los estudios de farmacocinética y de eficacia en nuevos compuestos son esenciales para evaluar su potencial terapéutico y la cinética del compuesto por vía intramuscular, por lo cual se marco el objetivo de evaluar la eficacia y cinética del CP α solubilizado inyectado por vía intramuscular en conejos Nueva Zelanda Blancos infectados en metacercarias de *Fasciola hepatica*. En caso de resultar exitoso, se podrán sentar las bases para elaborar una formulación inyectable para uso veterinario en rumiantes.

V.3. Material y métodos

Compuesto alfa.- El compuesto Alfa (5-cloro-2-metiltio-6-(1-naftiloxi)-1H-bencimidazol) se sintetizó en el departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (Hernández *et al.*, 2002).

Vehículos.- El glicerolformal (GF) y propilénglicol (PG) fueron obtenidos de una fuente comercial.

Metacercarias.- Las metacercarias de *Fasciola hepatica* fueron producidas en caracoles *Lymnaea humilis* a partir de la infección con miracidios de origen bovino obtenidos de un rastro local.

Animales.- Se utilizaron conejos Nueva Zelanda blancos de ocho meses de edad de ambos sexos los cuales tuvieron una semana de aclimatación en el Bioterio del Hospital de Nutrición “Salvador Subirán“. Su alojamiento fue convencional, su alimentación fue con alimento concentrado comercial y agua a libre acceso.

Infección.- Previo a la infección se realizaron análisis coprológicos para verificar que los conejos estuvieran libres de parásitos gastroentéricos. La infección se realizó con metacercarias de *Fasciola hepatica* con 15 días de enquistadas y conservadas en refrigeración a 5° C; previa anestesia por medio de sonda gástrica se administraron 90 metacercarias del trematodo.

Conducción del experimento.- Por medio de la técnica de sedimentación (Benedeck, 1946) se determinó la infección por *F. hepatica*, para después ser divididos en 4 grupos de 6 animales cada uno.

Tratamientos.-

El grupo 1 recibió una dosis de 1 mg/kg/IM del CP α solubilizado con GF con PG y H₂O.

El grupo 2 recibió una dosis de 2 mg/kg/IM del CP α solubilizado con GF con PG y H₂O, ambos en proporción 3:2:4.

Al grupo 3 con conejos negativos a la presencia de huevos de *Fasciola hepatica* se le administró el CP α solubilizado a una dosis de 4 mg/kg/IM. En todos los casos la aplicación se realizó por vía intramuscular a una concentración de 9.0 mg/ml.

El grupo 4 sirvió como testigo infectado sin tratamiento.

Las condiciones de alojamiento fueron conforme lo estipula la NOM-062-ZOO-1999.

Muestras de heces.- Se colectaron antes y durante 60 días después de la administración de las metacercarias de *Fasciola hepatica* y por 21 días posteriores al tratamiento para determinar la presencia de huevos por medio de la técnica de sedimentación (Benedeck, 1946).

El CP α se solubilizó con la combinación de vehículos GF con PG y H₂O en proporción 3:2:4 y con una concentración de 9.0 mg/ml de CP α .

Muestras de sangre.- Se colectaron de la vena marginal de la oreja (3 ml), antes de la administración de la formulación (tiempo 0) y cada 15, 30, 60, 120 minutos, 4, 8, 12 y 16 horas después del tratamiento. Las muestras de sangre se centrifugaron de inmediato a 2000g por 5 minutos, para obtener el plasma que se colocó en viales y se conservaron en congelación a -20° C hasta su uso en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Álvarez *et al.*, 1998).

Las muestras de suero fueron procesadas para su extracción y posterior inyección en el CLAR conforme al procedimiento descrito por Del Rivero *et al.*, 1998.

Condiciones cromatográficas.- Se utilizó un sistema cromatográfico con bomba binaria, automuestreador y detector de arreglo de diodos, a una longitud de onda de 304 nm. La fase móvil consistió en metanol, agua y acetonitrilo (40:40:20 v/v/v) en grado CLAR (Sigma-Aldrich.USA), degasificador en línea con helio. La fase estacionaria consistió en una

columna C18 de 80 mm de longitud. La suspensión a evaluar se filtró con membrana 0.45- μm (Millex- LCR syringe driven filter units Millipore), se inyectaron 25 microlitos de muestra, el flujo isocrático de 1.5 ml/min. El tiempo de corrida fue de 8 minutos, el tiempo de retención para el CP α fue de 1.5 minutos, sulfóxido de 2.5 minutos, sulfona de 3.0 minutos. Los límites de cuantificación fueron establecidos midiendo la mas baja concentración con un porcentaje de recuperación de 82.26, coeficiente de variación (CV) 4.5 %, coeficiente de correlación de 0.99, desviación estándar de 3.70 y variación entre ensayos o interlaboratorios de 8.683. El límite de cuantificación del equipo para el CP α solubilizado con los diferentes vehículos fue de 50 ng/ml.

La linealidad fue establecida con la concentración detectada por las muestras de vehículos y suero en relación a las muestras estándar a diferentes concentraciones (por triplicado).

Para la calibración de las curvas fueron calculados por medio de análisis de regresión lineal, coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de variación (CV).

Para obtener los estándares de los cromatogramas de las muestras de solubilidad y de suero se tomó en cuenta el área de la curva representada en el cromatograma para realizar la integración total del compuesto.

Para la transformación del ancho de la señal del cromatograma a la concentración de los estándares (concentraciones conocidas), se realizó una regresión con un valor de $r^2=0.999$. De cada muestra el ancho de la señal del cromatograma se realizó el estimado de la concentración utilizando la siguiente fórmula. $y = a + b * x$ donde a = intersección, b = pendientes y x = valor de la señal. Para determinar la concentración del compuesto solubilizado y en el suero se sumaron los anchos de columnas representadas en los cromatogramas del CP α , sulfóxido y sulfona.

Para el cálculo de la concentración del compuesto se empleo un estándar externo, con el método de adición se determinó el porcentaje de recuperación de la técnica analítica para establecer el porcentaje de recuperación del compuesto durante la extracción (Del Rivero *et al.*, 1998).

Eutanasia de los animales.- Previa eutanasia de los animales con una sobredosis de pentobarbital sódico administrado el día 21 después del tratamiento, se realizó la necropsia para evaluar el daño hepático en forma subjetiva con la observación macroscópica de las

lesiones que incluyen cambio de color, consistencia, tamaño, dilatación e incremento de los conductos biliares, presencia de abscesos y de cicatrices (Hayes *et al.*, 1973a; Hayes *et al.*, 1973b; Hayes *et al.*, 1973c; Corba *et al.*, 1981; Babicek y Danek, 1989).

La eutanasia, necropsia y disposición de los cadáveres de los conejos se realizó conforme a las normas NOM-087-ECOL-1995, NOM-062-ZOO-1999 y NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

Determinación de la eficacia fasciolicida del compuesto Alfa solubilizado.

La eficacia se determinó en base a:

- Presencia o no de *Fasciola hepatica* demostrable mediante examen de laboratorio, utilizando la necropsia helmintológica el día 22, posterior a la aplicación del tratamiento. Comparación de la cantidad de *Fasciola* encontrada en el grupo control (infectados sin tratar) mediante la fórmula de Wood *et al.*, (1995).

$$E = \frac{XC - XT}{XC} \times 100$$

E = Porcentaje de efectividad, XC = Cantidad promedio de fasciolas en el grupo control, XT = Cantidad promedio de fasciolas en el grupo tratado.

Análisis estadístico.- El número de huevos y para la comparación de medias del número de fasciolas colectadas del grupo tratado y control se transformó mediante la transformación de Box y Cox, $\log(\text{huevos}+1) \times 5.7579121$ y $[(\text{num.fasciolas} + 1)^{0.6} - 1] / 0.3677517$ respectivamente, para someter a análisis de varianza con la finalidad de determinar posibles diferencias significativas entre grupos y entre tratamientos, que determinó la diferencia de la reducción de fasciolas adultas (Zar, 1996). El análisis fue realizado por medio del paquete estadístico SAS (1990).

V.4. Resultados

El análisis coprológico mostró que el período de prepatencia para un conejo fue de un mes y para el resto de dos meses.

En el cuadro 4 se observa el promedio de huevos de *Fasciola hepatica* antes y después del tratamiento, el grupo 1 fue de 63.33 a 15.85 huevos por gramo de heces (hpgh), con una

eficacia de 25.02%; el grupo 2 fue de 9 a 4 hpgh, con una eficacia de 40.69% y en el grupo 3 sin tratamiento de 18 a 10.13 hpgh. Las diferencias entre los tratamientos no fueron significativas ($P>0.05$).

Con respecto a la media de fasciolas recuperadas se encontró en el grupo 1 de 5.5, con una eficacia de 16.67%; en el grupo 2 de 1, con una eficacia de 68.4%; grupo 3 como control de 3 trematodos. Se encontraron diferencias significativas en el número promedio de fasciolas entre los tratamientos ($P<0.05$) pero ninguno de ellos difiere del grupo control.

Con respecto al tamaño de las fasciolas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$) entre los tratamientos respecto al tamaño total de fasciola.

A los tres días de aplicado el tratamiento se observó una reducción de huevos en heces, pero en ningún caso los conejos fueron negativos durante los 21 días de evaluación después del tratamiento. Pero se encontró diferencia significativa ($P<0.05$) entre el número de huevos al inicio y al final.

La cinética del CP α determinado por el CLAR mostró que en todas las tomas de sangre no se encontró el CP α , ni sus metabolitos sulfóxido y sulfona, el límite de cuantificación del equipo fue de 2 ng/ml.

La figura 9 muestra los estándares del CP α y sus metabolitos sulfóxido y sulfona en suero control y tratamiento en conejos, medido por medio del CLAR.

V.5. Discusión

El modelo lagomorfo es adecuado para el estudio de parásitos como *Fasciola hepatica*, el período de prepatencia fue de uno a dos meses similar al reportado por Muro *et al.*, (1997).

Las lesiones macroscópicas encontradas fueron cambio de coloración, abscesos, fibrosis y colangitis similares a las reportadas por Muro *et al.*, (1997).

Después del tratamiento la presencia de huevos disminuyó para aumentar 15 días después, lo cual indicó la presencia de fasciolas, las cuales se recobraron y tuvieron variación en el tamaño pero no hubo diferencia estadística entre los grupos ($P>0.05$).

Se reporta que el uso de bencimidazoles en conejos tiene un metabolismo de primer paso y es probable que los conejos tienen una alta capacidad de metabolizar y excretar el sulfóxido y sulfona en forma más eficiente que los rumiantes (Marriner y Bogan, 1980; Marriner y

Bogan, 1981a; Marriner y Bogan, 1981b; Álvarez *et al.*, 1993). Al administrar triclabendazol y albendazol en conejos se encontraron concentraciones de sus metabolitos sulfóxido y sulfona en plasma (Álvarez *et al.*, 1993). La ausencia del CP α y sus metabolitos indica que se presentaron factores que afectaron la distribución y eficacia fasciolicida del compuesto.

Al usar la vía intramuscular la distribución del compuesto depende del balance de factores como: pKa, pH, liposolubilidad, la afinidad del compuesto con el vehículo formulado, volumen y profundidad de la inyección, perfusión del músculo, absorción del vehículo, reacción en el sitio de aplicación, la distribución del compuesto asociado al vehículo, las fuerzas físicas y químicas del tejido en movimiento, la contracción muscular; si los factores son favorables el compuesto se libera del vehículo atraviesa los capilares y se difunde en la sangre para ser metabolizado en el hígado y llegar al sitio de acción (Bjerregaard *et al.*, 2001; Zuidema *et al.*, 1988; Zuidema *et al.*, 1994; Ferré *et al.*, 2006).

Los vehículos utilizados como el GF y PG pueden reducir el tamaño de la partícula por lo cual favorecen la solubilidad y estabilidad de las emulsiones w/w (Floyd, 1999), pero el uso de cosolventes puede causar la precipitación del compuesto al contacto con los tejidos, la precipitación del compuesto o partículas pueden causar dolor en el sitio de aplicación, tromboflebitis, cambios en la sangre y disminución o pérdida de la biodisponibilidad del compuesto (Vyas, 1995, Li *et al.*, 1999b) esta característica influyo en la baja distribución del compuesto en el compartimiento vascular y la insuficiente eficacia contra *Fasciola hepatica*.

El albendazol y mebendazol son compuestos de amplio espectro por vía oral, pero cuando se usan en forma sistémica se requieren de altas dosis y de largos tratamientos debido a que son de pobre solubilidad en los fluidos corporales y decrece su absorción y biodisponibilidad (Cook, 1990), también en pruebas clínicas se muestra una alta variabilidad individual (Sharma, 1994). El CP α como derivado de los bencimidazoles se comporta en forma similar, esto es a mayor dosis aumento la eficacia contra el trematodo.

Los resultados sugieren que el CP α puede ser solubilizado si es reformulado con otros vehículos, utilizar otros procedimientos como el uso de micelios, nanosuspensiones, dispersión de sólidos microemulsiones, liposomas, nanopartículas de lípidos sólidos (Li *et*

al., 1999c), así como realizar cambios en la estructura química para mejorar su solubilidad como se ha realizado en el albendazol (Rivera *et al.*, 2007). De esta forma favorecer el paso del compuesto del compartimiento tisular al plasmático, sea metabolizado en hígado y llegar al sitio de acción en concentración adecuada y aumentar su eficacia contra *Fasciola hepatica*.

V.6. Conclusión

El compuesto Alfa solubilizado y administrado por vía intramuscular en conejos tuvo una eficacia insuficiente contra *Fasciola hepatica*.

V.7. Referencias

1. Álvarez BML, Ortiz AI, Negro A, Cubría JC, Ordoñez D. Pharmacokinetics of triclabendazole in rabbits. *Comp Biochem Physiol* 1993; 106(3):805-808.
2. Álvarez BL, Ortiz AI, Molina MI, Cubría C, Ordoñez D. Pharmacokinetics of intravenous luxabendazole in rabbits: influence of the enterohepatic circulation. *Biopharm. Drug Dispos* 1998; 19:341-347.
3. Athanassiou G. Antimicrobial activity of beta-lactam antibiotics against clinical pathogens after molecular inclusion in several cyclodextrins. A novel approach to bacterial resistance *J Pharm Pharmacol* 2003; 55:291–300.
4. Babicek K, Danek J. Checking the method of testing antifasciolles on the model helminth *Fasciola hepatica* in experimentally invaded laboratory rats. *Biol Chem Vet (Praha)* 1989; 25:311-320.
5. Benedeck L. Examination of liver fluke eggs with sedimentation technique. *Allatorov Lepak* 1946; 66:139-144.
6. Bjerregaard S, Pedersen H, Vedstesen H, Vermehren C, Soderberg I, Frokjaer S. Parenteral water/oil emulsions containing hydrophilic compound with enhanced *in vivo* retention: formulation, rheological characterisation and study of *in vivo* fate using whole body gamma-scintigraphy. *Int J Oharm* 2001; 215:13-27.
7. Cook GC. Use of benzimidazole chemotherapy in human helminthiases: Indications and efficacy. *Parasit today* 1990; 6:133-216.

8. Corba J, Velebny S, Spaldonova R. Primary screening of newly synthesized substances in white mice invaded with *Fasciola hepatica*. *Helminthology* 1981; 18:43-52.
9. Del Rivero LM, Jung H, Castillo R, Hernández CA. High-performance liquid chromatographic assay for a new fasciolicide agent, α BIOF10, in biological fluids. *J Chrom B* 1998; 72:237-241.
10. Ferré PJ, Laroute V, Braun JP, Cazaux J, Toutain PL, Lefebvre HP. Simultaneous and minimally invasive assessment of muscle tolerance and bioavailability of different volumes of an intramuscular formulation in the same animals. *J Anim Sci* 2006; 84:1295-1301.
11. Floyd AG. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. *PSTT*. 1999; 2(4):134-143.
12. Hayes TJ, Bailer J, Mitrovic M. The pattern of mortality in mice experimentally infected with *Fasciola hepatica*. *Int J Parasit* 1973a; 3:665-669.
13. Hayes TJ, Bailer J, Mitrovic M. The chemotherapeutic activity of selected fasciolicides against immature *Fasciola hepatica* in mice. *Experientia* 1973c; 29:899-900.
14. Hernández CA, Ibarra VF, Vera MY, Rivera FN, Castillo BR. Synthesis and Fasciolicidal Activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)-1*H*benzimidazole. *Chem Pharm Bull* 2002; 50(5): 649-652.
15. Li P, Tabibi SE, Yalkoswsky SH. (1999b) Solubilization of flavopiridol by pH control combined with cosolvents, surfactants, or complexants. *J Pharm Sci* 1999b; 88:945-947.
16. Marriner SE, Bogan JA. Pharmacokinetics of albendazole in sheep. *Am J Vet Res* 1980; 42:1126-1129.
17. Marriner SE, Bogan JA. Pharmacokinetics of fendenzadole in sheep. *Am J Vet Res* 1981a; 42:1146-1148.
18. Marriner SE, Bogan JA. Pharmacokinetics of oxfendazole in sheep. *Am J Vet Res* 1981b; 42:1143-1145.
19. Muro A, Ramajo B, López J, Simón F, Hiller GV. *Fasciola hepatica*: Vaccination of rabbits with native and recombinant antigens related to fatty acid bindings proteins. *Vet Parasit* 1997; 69:219-229.

20. Rivera JC, Yopez ML, Hernández CA, Moreno ER, Castillo BR, Navarrete VG, Fuentes NI, Jung CH. Biopharmaceutics evaluation of novel anthelmintic (1H-benzimidazol-5(6)-Y1) Carboxamide derivates. *Int J Pharm* 2007; 343:159-165.
21. Sharma, S. Design of new drugs for helminth diseases lead optimization in benzimidazoles. *Ad Drug Res* 1994; 25:103-172.
22. Vera MY, Ibarra VF, Liéban HE, Quiroz RH, Castillo BR, Hernández CA, Ochoa GP. Efficacy of an experimental fasciolicide against immature and mature *Fasciola hepatica* in artificially infected calves. *Parasit Res* 2004; 92:211-214.
23. Vyas, D.M. Paclitaxel (Taxol) formulations and prodrugs. In: Farina. V. (Ed.) *The Chemistry and Phatmacology of Taxol and its Derivates*. Elsevier Science. 1995. Vritish Vanciuver.
24. Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai J, Malone JB, Pankavich JA, Reinecke RK, Slocombe O. World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP), second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants. *Vet Parasitol* 1995; 58:181-213.
25. Zar JH. *Biostatistical Anaylsis*. Ed. Prentice-Hall. NJ. 1996. pp. 620.
26. Zuidema J, Pieters FAJM, Duchateau GSMJE. Release and absorption rate aspects of intramuscular injected pharmaceuticals. *Int J Pharm* 1988; 47:1-2.
27. Zuidema J, Kadir F, Tilulaer HAC, Oussoren C. Release and absorption rate aspects of intramuscular injected pharmaceuticals. II. *Int J Pharm* 1994; 105:189-207.

Cuadro 4. Eficacia fasciolicida del compuesto Alfa administrado en formulación inyectable en conejos

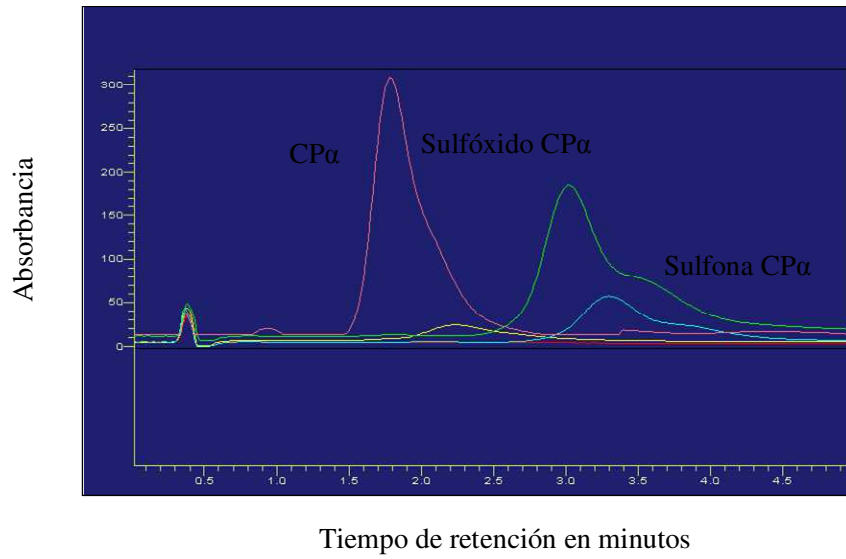
Grupo (n=6)	Dosis CP α *** mg/kg/IM	Fasciolas adultas recuperadas	Porcentaje de eficacia		Promedio de hpg**	
		(media)*	Reducción de huevos	Reducción de fasciolas	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
1	1	5.5a	25.02	16.67	63.33	15.85
2	2	1.0b	40.69	68.4	9.83	4
3	Control	3.0ab	0	0	18	10.13

*Literales diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (P<0.05)

**hpg= Huevos por gramo.

***CP α = Compuesto Alfa.

Figura 9. Estándares del compuesto Alfa y sus metabolitos sulfóxido y sulfona en suero control y tratamiento de conejos, medido por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución



VI. EXPERIMENTO 5. EFICACIA Y CINÉTICA DE UN FASCIOLICIDA EXPERIMENTAL POR VÍA INTRAMUSCULAR EN OVINOS INFECTADOS ARTIFICIALMENTE CON *Fasciola hepatica*

VI.1. Resumen

Los objetivos del estudio fue evaluar en ovinos Pelibuey la eficacia fasciolicida y la farmacocinética del compuesto Alfa, con la combinación de glicerolformal con propilén glicol y agua en proporción 3:2:4 que solubilizó al compuesto Alfa en 100 %.

Se utilizaron 24 ovinos Pelibuey machos de 10 meses de edad, los cuales se infectaron con 250 metacercarias de *Fasciola hepatica*, al ser positivos por coprología y serología se formaron 4 grupos de 6 animales cada uno y se aplicó el compuesto a una dosis de 1 y 2 mg/kg/IM de compuesto Alfa solubilizado y 1 mg/kg/IM de sulfóxido de compuesto Alfa y un grupo como control.

La evaluación *in vivo* en ovinos mostró que el compuesto Alfa administrado a 1 mg/kg tuvo una eficacia de 56.46 %, con 2 mg/kg de 68.4 % y con sulfóxido del compuesto Alfa a 1 mg/kg tuvo 73.95 %. No se encontró el compuesto Alfa, ni sus metabolitos en el suero por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

Se concluye que el compuesto Alfa solubilizado e inyectado por vía intramuscular en ovinos mostró una eficacia insuficiente contra *Fasciola hepatica* adulta.

Palabras clave. Compuesto Alfa, CLAR, ciclodextrinas, vehículos, intramuscular, eficacia.

VI.2. Introducción

El compuesto Alfa o 5-cloro-2-metilthio-6-(1-naftiloxi)-1*H*-bencimidazol (Hernández *et al.*, 2002), ha mostrado alta eficacia fasciolicida bajo condiciones *in vivo* por vía oral en ovinos (Ibarra *et al.*, 1996; Ibarra *et al.*, 1997b; Rivera *et al.*, 2002). Sin embargo, su solubilidad es muy pobre en agua, por lo que se manifiesta importante realizar esfuerzos encaminados a solubilizarlo con el fin de obtener una formulación inyectable.

Una alternativa para solubilizar diferentes compuestos es con el uso de vehículos como ciclodextrinas, propilénglicol (PG) y glicerolformal (GF) los cuales pueden aumentar la solubilidad, estabilidad química y biodisponibilidad, modificar la absorción y la concentración del compuesto en sangre (Lo *et al.*, 1985; Wicks *et al.*, 1993).

Actualmente los estudios de farmacocinética y de eficacia en nuevos compuestos son esenciales para evaluar su potencial terapéutico y la cinética del CP α por vía intramuscular, por lo cual se marcó el objetivo de evaluar la eficacia y cinética del CP α solubilizado e inyectado por vía intramuscular, en ovinos pelibuey infectados en forma artificial con metacercarias de *Fasciola hepatica*. En caso de resultar exitoso, se podrán sentar las bases para elaborar una formulación inyectable para uso veterinario en rumiantes.

VI.3. Material y métodos

Solubilidad del compuesto Alfa.- La solubilidad del CP α se realizó con la combinación de vehículos glicerolformal (GF), propilénglicol (PG) y agua (H₂O) en proporción 3:2:4 a una concentración de 10.86 mg/ml, los vehículos fueron obtenidos de una fuente comercial (Sigma-Aldrich.USA). Cada muestra se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa, para ser inyectado en el CLAR, se determinó la solubilidad en forma física por transparencia de los vehículos con el compuesto y por medio del CLAR (Athanassiou *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2003).

Condiciones cromatográficas.- Se utilizó un sistema cromatográfico con bomba binaria, automuestreador y detector de arreglo de diodos, a una longitud de onda de 304 nm. La fase móvil consistió en metanol, agua y acetonitrilo (40:40:20 v/v/v) en grado CLAR (Sigma-Aldrich.USA), degasificador en línea con helio. La fase estacionaria consistió en una

columna C18 de 80 mm de longitud. La suspensión a evaluar se filtró con membrana 0.45- μm (Millex- LCR syringe driven filter units Millipore), se inyectaron 25 microlitos de muestra, el flujo isocrático de 1.5 ml/min. El tiempo de corrida fue de 8 minutos, el tiempo de retención para el CP α fue de 1.5 minutos, sulfóxido de 2.5 minutos, sulfona de 3.0 minutos. Los límites de cuantificación fueron establecidos midiendo la más baja concentración con un porcentaje de recuperación de 82.26, coeficiente de variación (CV) 4.5 %, coeficiente de correlación de 0.99, desviación estándar de 3.70 y variación entre ensayos o interlaboratorios de 8.683. El límite de cuantificación del equipo para el CP α solubilizado con los diferentes vehículos fue de 50 ng/ml y en suero de 2 ng/ml.

La linealidad fue establecida con la concentración detectada por las muestras de vehículos y suero en relación a las muestras estándar a diferentes concentraciones (por triplicado).

Para la calibración de las curvas fueron calculados por medio de análisis de regresión lineal, coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de variación (CV).

Para obtener los estándares de los cromatogramas de las muestras de solubilidad y de suero se tomó en cuenta el área de la curva representada en el cromatograma para realizar la integración total del compuesto.

Para la transformación del ancho de la señal del cromatograma a la concentración de los estándares (concentraciones conocidas), se realizó una regresión con un valor de $r^2=0.999$. De cada muestra el ancho de la señal del cromatograma se realizó el estimado de la concentración utilizando la siguiente fórmula. $y = a + b * x$ donde a = intersección, b = pendientes y x = valor de la señal. Para determinar la concentración del compuesto solubilizado y en el suero se sumaron los anchos de columnas representadas en los cromatogramas del CP α , sulfóxido y sulfona.

Para el cálculo de la concentración del compuesto se empleó un estándar externo, con el método de adición se determinó el porcentaje de recuperación de la técnica analítica para establecer el porcentaje de recuperación del compuesto durante la extracción (Del Rivero *et al.*, 1998).

Animales.- Se utilizaron 24 ovinos Pelibuey machos de 10 meses de edad, libres de fasciolosis, alojados en corrales de encierro convencional, alimento balanceado y agua a libre acceso en la Universidad de Querétaro.

Infección.- Previa semana de adaptación en el día 0 los animales se infectaron con 250 metacercarias de *Fasciola hepatica* las cuales tenían 15 días de enquistadas y conservadas en refrigeración a 5° C.

Análisis fecal.- Se colectaron muestras fecales en los días -8, 70 y 90 para la búsqueda de huevos del trematodo por medio de la técnica de sedimentación (Benedeck, 1946).

Prueba de ELISA.- Se colectó sangre en los días -8 y 30 para obtención de suero para detectar anticuerpos anti *Fasciola hepatica* por medio de la técnica de ELISA (Ibarra *et al.*, 1998).

Muestras de sangre.- Se colectaron de la vena yugular (5 ml), antes de la administración del CP α solubilizado (tiempo 0) y cada 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 30, 36, 48, 72, 96, 120 y 144 horas después del tratamiento. Las muestras de sangre se centrifugaron inmediatamente a 2000g por 5 minutos, para obtener el suero que se colocaron en viales y se conservaron en congelación a -20° C hasta su análisis en el CLAR (Álvarez *et al.*, 1998). Las muestras de suero fueron procesadas para su extracción y posterior inyección en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR) conforme al procedimiento descrito por Del Rivero *et al.*, (1998).

Conducción del experimento. Se seleccionaron 4 grupos de 6 animales cada uno con base en los conteos de huevos de fasciola de las muestras de heces tomadas en el día -8 (MAFF, 1988).

Tratamientos.-

El grupo 1 se administro una dosis de 1 mg/kg/IM del CP α solubilizado con GF con PG y H₂O (3:2:4), con una concentración de 10.86 mg/ml.

El grupo 2 se administro una dosis de 2 mg/kg/IM del CP α solubilizado con GF, PG y H₂O (3:2:4), con una concentración de 10.86 mg/ml.

El grupo 3 se administro una dosis de 1 mg/kg/IM de sulfóxido del CP α solubilizado con GF, PG y H₂O (3:2:4), con una concentración de 8.9 mg/ml.

El grupo 4 sirvió como testigo infectado sin tratamiento.

Evaluación.- La eficacia se determinó en base a la presencia de huevos o fasciolas presentes en el grupo tratado con respecto al grupo testigo, de acuerdo a la fórmula descrita por Wood *et al.*, (1995).

$$E = \frac{XC - XT}{XC} \times 100$$

E = Porcentaje de efectividad, XC = Promedio de fasciolas en el grupo control, XT = Cantidad promedio de fasciolas en el grupo tratado.

Análisis estadístico.- La información obtenida fue sometida a análisis de varianza con la finalidad de determinar posibles diferencias significativas entre grupos y entre tratamientos. La comparación de medias del número de fasciolas colectadas del grupo tratado y control se realizó por medio de la prueba de Kruskal-Wallis, que determinó la diferencia de la reducción de fasciolas adultas (Zar, 1996). El análisis fue realizado por medio del paquete estadístico SAS (1990).

Para el análisis de los huevos del trematodo antes y después del tratamiento se realizó la transformación de Box y Cox utilizando la transformación de [(huevos finales) -0.2-1]/-0.008615735)].

VI.4. Resultados

En el Cuadro 5 se aprecia el promedio de huevos de *Fasciola hepatica* antes y después del tratamiento: en el Grupo 1, con 89.16 y 14.66 h/g/h; en el Grupo 2, de 30.33 y 16.66 h/g/h y en el Grupo 3 de 24.83 y 23.16 h/g/h, en el grupo 4 de 125 y 133.5 h/g/h, respectivamente. El porcentaje de reducción de huevos fue para el grupo 1, de 89, grupo 2, de 87.53 y el grupo 3, de 82.65.

La cantidad de huevos por gramo de heces después del tratamiento no fue estadísticamente significativa entre tratamientos ($P > 0.05$).

El recobro de fasciolas adultas en promedio fue: grupo 1, de 36.29; grupo 2, de 37.79; grupo 3, de 33.96, y grupo 4, de 74.96 fasciolas. El análisis del número de fasciolas por ovino muestra que no hay diferencia significativa, por lo cual no hay diferencias entre los tratamientos pero si entre estos y el testigo ($P < 0.05$).

El tamaño promedio (longitud) de las fasciolas de los grupos, aunque varió, sólo hubo diferencia numérica. El porcentaje de eficacia para el Grupo 1 fue de 56.46%, para el Grupo 2, de 68.4% y para el grupo 3, de 73.9%. El análisis de la longitud total promedio de

las fasciolas muestra que no hay diferencia significativa, por lo cual hay diferencias entre los tratamientos y con el testigo ($P < 0.05$).

La figura 10 muestra los estándares del compuesto Alfa y sus metabolitos sulfóxido y sulfona en suero control y tratamiento en ovinos, medido por medio del CLAR.

VI.5. Discusión

La administración del CP α por vía oral tiene alta eficacia fasciolicida (Ibarra *et al.*, 2004), se ha demostrado que en suero de ovinos no hay presencia del CP α pero si de los metabolitos sulfóxido y sulfona, determinado por medio del CLAR, lo cual muestra que tiene una cinética de primer orden (Vértiz, 2000), con una remoción completa de la sangre al ser rápidamente oxidado en hígado en sus metabolitos sulfóxido y sulfona antes de pasar a la circulación general, como ocurre con el albendazol, triclabendazol y otros bencimidazoles (Hennessy *et al.*, 1987; Oukessou *et al.*, 1991).

Al usar la vía intramuscular la distribución del compuesto al compartimiento vascular depende del balance de factores como: la afinidad del compuesto con el vehículo formulado, volumen y profundidad de la inyección, perfusión del músculo, absorción del vehículo, reacción en el sitio de aplicación, liposolubilidad del compuesto, la distribución del compuesto asociado al vehículo, las fuerzas físicas y químicas del tejido en movimiento, la contracción muscular; si los factores son favorables el compuesto se libera del vehículo atraviesa los capilares y se difunde en la sangre para ser absorbido, metabolizado y llegar al sitio de acción (Bjerregaard *et al.*, 2001; Zuidema *et al.*, 1988; Zuidema *et al.*, 1994; Ferré *et al.*, 2006).

Los vehículos utilizados como el GF y PG pueden reducir el tamaño de la partícula por lo cual favorecen la solubilidad y estabilidad de las emulsiones w/w (Floyd, 1999), pero el uso de cosolventes puede causar la precipitación del compuesto al contacto con los tejidos, la precipitación del compuesto o partículas pueden causar dolor en el sitio de aplicación, tromboflebitis, cambios en la sangre y disminución o pérdida de la biodisponibilidad del compuesto (Li *et al.*, 1999b) esta característica influyo en la baja distribución del compuesto en el compartimiento vascular y la insuficiente eficacia contra *Fasciola hepatica*.

El albendazol y mebendazol son compuestos de amplio espectro por vía oral, pero cuando se usan en forma sistémica se requieren de altas dosis y de largos tratamientos debido a que son de pobre solubilidad en los fluidos corporales y decrece su absorción y biodisponibilidad (Cook, 1990), también en pruebas clínicas se muestra una alta variabilidad individual (Sharma, 1994). El CP α como derivado de los bencimidazoles se comporta en forma similar, esto es a mayor dosis aumento la eficacia contra el trematodo.

En el caso del CP α administrado a 12 mg/kg por vía oral en ovinos, no se detecto el CP α en ninguno de los tiempos de muestreo por lo cual el compuesto es extensamente oxidado por el hígado en un metabolismo de primer paso, así mismo las concentraciones máximas en plasma del sulfóxido fue de 8.0 μ g/ml lo cual proporciono concentraciones plasmáticas para un 100 % de eficacia contra el trematodo (Del Rivero *et al.*, 1998).

Con la información previa se infiere que en ovinos la aplicación intramuscular de 1 y 2 mg/kg en forma hipotética se debe encontrar en suero una concentración de 0.66 y 1.33 μ g/ml respectivamente, la cual es insuficiente para eliminar los trematodos. Al no encontrarse la presencia en suero del sulfóxido de CP α y tener eficacia se debe a la gran potencia fasciolicida del metabolito (Rivera *et al.*, 2004; Ramírez, 2007).

La mejor eficacia se encontró con el sulfóxido del CP α , el cual es más soluble y se le asocia la actividad fasciolicida (Vértiz, 2000; Rivera *et al.*, 2004; Ramírez, 2007), como se ha reportado para el triclabendazol (Mahammed *et al.*, 1990; Virkel *et al.*, 2006) y el albendazol (Sánchez *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 1998), a pesar de sus características no fue detectado por medio del CLAR y su uso en formulaciones por vía intramuscular es restringido debido a que es un metabolito muy inestable y cambia fácilmente a sulfona el cual es inactivo contra *Fasciola hepatica* (Vértiz, 2000; Ramírez, 2007).

Los resultados sugieren que el CP α puede ser solubilizado si es reformulado con otros vehículos, así como utilizar otros procedimientos como el uso de micelios, nanosuspensiones, dispersión de sólidos microemulsiones, liposomas, nanopartículas de lípidos sólidos (Li *et al.*, 1999c), realizar cambios en la estructura química para mejorar su solubilidad como se ha realizado en el albendazol (Rivera *et al.*, 2007). De esta forma favorecer el paso del compuesto del compartimiento tisular al plasmático, sea metabolizado

en hígado y llegar al sitio de acción en concentración adecuada y aumentar su eficacia contra *Fasciola hepatica*.

VI.6. Conclusión

El compuesto Alfa administrado por vía intramuscular en ovinos mostró una eficacia insuficiente contra *Fasciola hepatica*.

VI.7. Referencias

1. Álvarez BML, Ortiz AI, Molina MI, Cubría C, Ordoñez D. Pharmacokinetics of intravenous luxabendazole in rabbits: influence of the enterohepatic circulation. *Biopharm Drug Dispos* 1998; 19:341-347.
2. Athanassiou G. Antimicrobial activity of beta-lactam antibiotics against clinical pathogens after molecular inclusion in several cyclodextrins. A novel approach to bacterial resistance. *J Pharm* 2003; 55:291-300.
3. Benedeck L. Examination of liver fluke eggs with sedimentation technique. *Allatorov Lapak* 1946; 66:139-144.
4. Bjerregaard S, Pedersen H, Vedstesen H, Vermehren C, Soderberg I, Frokjaer S. Parenteral water/oil emulsions containing hydrophilic compound with enhanced *in vivo* retention: formulation, rheological characterisation and study of *in vivo* fate using whole body gamma-scintigraphy. *Int J Oharm* 2001; 215:13-27.
5. Cook GC. Use of benzimidazole chemotherapy in human helminthiases: Indications and efficacy. *Parasitol today* 1990; 6:133-216.
6. Del Rivero, L.M., Jung, H., Castillo, R. & Hernández, C.A. High-performance liquid chromatographic assay for a new fasciolicide agent, α BIOF10, in biological fluids. *J Chrom B* 1998; 72:237-241.
7. Ferré PJ, Laroute V, Braun JP, Cazaux J, Toutain PL, Lefebvre HP. Simultaneous and minimally invasive assessment of muscle tolerance and bioavailability of different volumes of an intramuscular formulation in the same animals. *J Anim Sci* 2006; 84:1295-1301.

8. Floyd AG. Top ten considerations in the development of parenteral emulsions. PSTT. 1999; 2(4):134-143.
9. Hennessy DR, Lacey E, Steel JW, Prichard RK. The kinetics of triclabendazole disposition in sheep. J Vet Pharm Therap 1987; 10:64-72.
10. Hernández CA, Ibarra VF, Vera MY, Rivera FN, Castillo BR. Synthesis and Fasciolicidal Activity of 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthyloxy)-1*H*benzimidazole. Chem Pharm Bull 2002; 50(5): 649-652.
11. Ibarra VF, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia de un compuesto experimental contra *Fasciola hepatica* juvenil y adulta en ganado ovino. Vet Méx 1996; 27:119-122.
12. Ibarra VF, Vera MY, Hernández CA, Castillo BR. Eficacia fasciolicida del compuesto "alfa" contra estadios juveniles y adultos en ovinos. Vet Méx 1997b; 28:(4) 297- 301.
13. Ibarra VF, Montenegro N, Vera MY, Boulard Ch, Quiroz H, Flores J, Ochoa P. Comparison of three ELISA test for seroepidemiology of bovine fascioliosis. Vet Parasitol 1998; 77:229-236.
14. Ibarra FV, Vera MY, Quiroz RH, Cantó J, Castillo BR, Hernández A, Ochoa P. Determination of the effective dose of an experimental fasciolicide in naturally and experimentally infected cattle. Vet Parasitol 2004; 120:65-74.
15. Jung H, Medina L, García L, Fuentes I, Moreno R. Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of drug and its metabolite albendazole sulphoxide. J Pharmacy Pharm 1998; 50:43-48.
16. Li P, Tabibi SE, Yalkoswsky SH. Solubilization of ionized and unionized flavopiridol by ethanol and polysorbate 20. J Pharm Sci 1999c; 88:507-509.
17. Lo P, Fink D, Williams J, Blodinger J. Pharmacokinetics studies of ivermectin effect of formulation. Vet Res Commun 1985; 9:251-268.
18. MAFF. (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food). Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques. Technical Bulletin No. 18. Her Majesty's Stationery Office. London, Great Britain. 1988.

19. Mahammed ANA, Bogan JA, Marriner SE, Richards RJ. Pharmacokinetics of triclabendazole alone or in combination with fenbendazole in sheep. *J Vet Pharm Therap* 1990; 16:442-445.
20. Nakamura K. Potential use of cyclodextrins to enhance the solubility of YM466 in aqueous solution. *Drug Dev Ind Pharm* 2003; 29:903–908.
21. Oukessou M, Toutain PL, Galtier P, Alvinerie M. Comparative pharmacokinetics of triclabendazole in camel and sheep. *Revue Elev Medicine Vet Pays Trop* 1991; 44:447-452.
22. Ramírez ANA. Estudios biofarmacéuticos del α BIOF10 un nuevo agente fasciolicida. Facultad de Química. Tesis de grado de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma México. México, D.F. 2007.
23. Rivera FN, Ibarra VF, Olazarán JS, Vera MY, Castillo BR, Hernández CA. Eficacia del 5-chloro-2-methylthio-6-(1-naphthylthio) benzimidazole contra diversas edades de *Fasciola hepatica* en ovinos. *Vet Méx* 2002; 33(1):55–61.
24. Rivera N, Ibarra F, Zepeda A, Fortoul T, Hernández A, Castillo R, Cantó G. Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment in vitro and in vivo with an experimental fasciolicide. *Parasitol Res* 2004; 93:283-286
25. Rivera JC, Yopez ML, Hernández CA, Moreno ER, Castillo BR, Navarrete VG, Fuentes NI, Jung CH. Biopharmaceutics evaluation of novel anthelmintic (1H-benzimidazol-5(6)-Y1) Carboxamide derivates. *Int J Pharm* 2007; 343:159-165.
26. Sánchez S, Alvarez LI, Lanusse CE. Fasting-induced changes to the pharmacokinetics behaviour of albendazole and its metabolites in calves. *J Vet Pharm Therap* 1997; 20:38-47.
27. Sharma S. Design of new drugs for helminth diseases lead optimization in benzimidazoles. *Adv Drug Res* 1994; 25:103-172.
28. Vértiz SG. Evaluación farmacocinética de α BIO10 en ganado vacuno. Tesis de Maestra en Farmacia (Biofarmacia). Facultad de Química. División de estudios de Posgrado. Universidad Nacional Autónoma de México. 2000.

29. Virkel G, Lifschitz A, Saliowitz J, Pis A, Lanusse C. Assessment of the main metabolism pathways for the flukicidal compound triclabendazole in sheep. *J Vet Pharm Therap* 2006; 29:213-223.
30. Wicks S, Kaye B, Weatherley A, Lewis D, Davison E, Gibson S, Smith D. Effect formulation the pharmacokinetics and efficacy of doramectin. *Vet Parasitol* 1993; 49: 17-26.
31. Wood IB, Amaral NK, Bairden K, Duncan JL, Kassai J, Malone JB, Pankavich JA, Reinecke RK, Slocombe O, Taylor SM, Vercruysse J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine and caprine). *Vet Parasitol* 1995; 58:181-213.
32. Zar JH. *Biostatistical Analysis*. Ed. Prentice-Hall. NJ. 1996. pp. 620.
33. Zuidema J, Pieters FAJM, Duchateau GSMJE. Release and absorption rate aspects of intramuscular injected pharmaceuticals. *Int J Pharm* 1988; 47:1-2.
34. Zuidema J, Kadir F, Tilulaer HAC, Oussoren C. Release and absorption rate aspects of intramuscular injected pharmaceuticals. II. *Int J Pharm* 1994; 105:189-207.

Cuadro 5. Compuesto Alfa: Eficacia Fasciolicida en tres diferentes formulaciones inyectables en ovinos

Grupo	Formulación	Dosis	Media de hpgh **		Eficacia	Recobro de fasciolas adultas de hígado (Media ± SE)*	Eficacia	Largo de Fasciolas (mm) (Media ± SE)*
			Antes del tratamiento	Después del tratamiento				
(n=6)		mg/kg/IM			% Reducción de huevos		% Reducción de fasciolas en hígado	
1	*** Cα	1	89.16	14.66	89	36.29b ± 4.74	56.46	35.94a ± 5.28
2	Cα	2	30.33	16.66	87.52	37.79b ± 5.33	68.4	37.56a ± 5.94
3	**** SO2	1	24.83	23.16	82.65	33.96b ± 5.51	73.9	35.49a ± 6.14
4		Control	125.5	133.5	'-----	74.96 ± 7.5	'-----	73.50b ± 8.36

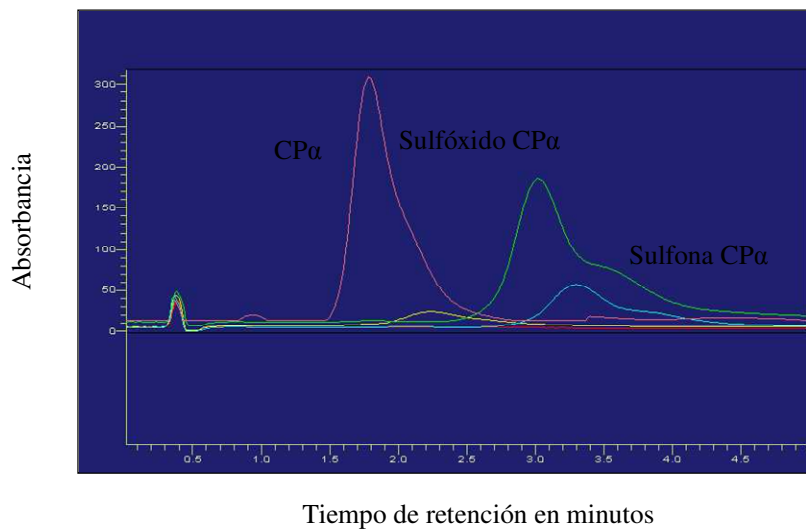
*Diferentes literales indican diferencia significativa entre tratamientos (P<0.05)

**hpgh= Huevos por gramo de heces

***CPα= Compuesto Alfa

**** SO2= Metabilito sulfóxido de compuesto Alfa

Figura 10. Estándares del compuesto Alfa y sus metabolitos sulfóxido y sulfona en suero control y tratamiento en ovinos, medido por medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución



VII. Conclusiones generales

El compuesto Alfa como un derivado de los bencimidazoles es insoluble en agua, pero en los experimentos realizados se solubilizó al compuesto Alfa en 100 %, con una eficacia fasciolicida *in vitro* del 100 % y es inocuo al ser administrado por vía intramuscular en ratones. Esto representa un avance prometedor e importante en la obtención de una formulación inyectable intramuscular del compuesto Alfa.

Se debe considerar que la formulación inyectable del compuesto Alfa al ser aplicado en conejos y ovinos tuvo una eficacia insuficiente, el compuesto Alfa y sus metabolitos no fueron detectados por el medio del cromatógrafo de líquidos de alta resolución, aun así se observó que el compuesto tiene eficacia contra *Fasciola hepatica*. Por lo cual al hacer modificaciones a la formulación se podrá facilitar el paso del compuesto del compartimiento tisular al vascular para tener una alta eficacia fasciolicida en rumiantes.

VIII. Artículos publicados y en proceso

Artículo publicado

SOLUBILIZATION APPROACHES AND EVALUATION OF AN EXPERIMENTAL FASCIOLICIDE UNDER IN VITRO CONDITIONS AND IN THE NATURAL HOST

Javier Arturo Munguía Xóchihua¹, Froylán Ibarra Velarde², René Rosiles M.³, Janitzio A. Bautista Ordoñez³, Francisco Hernández Luis⁴, Rafael Castillo Bocanegra⁴, Yolanda Vera Montenegro², Alicia Hernández Campos⁴, Antonio Romo Mancillas⁴, Jorge Cantó Alarcón⁵, Adriana Ducoing Watty⁶

¹Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 sur, colonia centro, CP 85000, Cd. Obregón, Sonora, México. jmunguia@itson.mx

²Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal. México.

³Departamento de Nutrición. Laboratorio de Toxicología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal. México.

⁴Departamento de Farmacia, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal. México.

⁵Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma de Querétaro, Qro., México.

⁶Departamento de Genética y Estadística. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal. México.

Artículos en proceso

EFFICACY AND PHARMACOKINETICS OF AN EXPERIMENTAL FASCIOLICIDE IN ARTIFICIALLY-INFECTED RABBITS

Javier Arturo Munguía Xóchihua¹, Froylán Ibarra Velarde², René Rosiles M.³, Janitzio Bautista O.³, Rafael Castillo Bocanegra,⁴ Francisco Hernández Luis⁴, Rafael Hernández González,⁵ Oscar Villanueva Sánchez,⁵ Yolanda Vera Montenegro,² Alicia Hernández Campos⁵, Antonio Romo Mancilla⁵, Yazmín Alcalá Canto², Adriana Ducoing Watty⁶

¹Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero 818 sur. CP 85000 Colonia Centro. Cd. Obregón, Sonora, México. jmunguia@itson.mx

²Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal. México.

³Departamento de Nutrición. Laboratorio de Toxicología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal. México.

⁴Departamento de Farmacia, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal. México.

⁵Hospital de Nutrición "Salvador Suribán". Unidad de Bioterio. Distrito Federal. México.

⁶Departamento de Genética y Estadística. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal. México.

HISTOPATHOLOGICAL CHANGES IN SKELETAL MUSCLE OF MICE AFTER THE ADMINISTRATION OF AN EXPERIMENTAL FASCIOLICIDE

Javier Arturo Munguía Xóchihua¹, Froylan Ibarra Velarde², Rene Rosiles M.³ Janitzio A. Bautista O.³, Luis Hernández Francisco⁴, Rafael Castillo Bocanegra⁴, Alicia Hernández Campos⁴, Yolanda Vera Montenegro², José Ramírez Lezama⁵ y Yazmín Alcalá Canto²

¹*Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón, Sonora, México.*
jmunguia@itson.mx

²*Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal. México.*

³*Departamento de Nutrición. Laboratorio de Toxicología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal. México.*

⁴*Departamento de Farmacia, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal. México*

⁵*Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal. México.*