



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA DE {5-[(4-NITROBENCIL)CARBAMOIL]-1H-BENCIMIDAZOL-2-IL}CARBAMATO DE METILO, UN NUEVO COMPUESTO CON ACTIVIDAD CISTICIDA, EN RATAS

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. JOSÉ GUADALUPE BECERRIL VEGA

TUTORA: DRA. HELGI HELENE JUNG

FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F., Marzo 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**EVALUACIÓN DE LA FARMACOCINÉTICA DE {5-[(4-
NITROBENCIL)CARBAMOIL]-1H-BENCIMIDAZOL-2-IL}CARBAMATO DE
METILO, UN NUEVO COMPUESTO CON ACTIVIDAD CISTICIDA, EN RATAS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. JOSÉ GUADALUPE BECERRIL VEGA



TUTORA: DRA. HELGI HELENE JUNG

México D.F., 2016

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dra. Raquel López Arellano
PRIMER VOCAL	Dra. Flora Adriana Ganem Rondero
SEGUNDO VOCAL	Dra. Agnés Odile Fleury
TERCER VOCAL	Dr. Francisco Hernández Luis
SECRETARIA	Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

Tutora

Dra. Helgi Helene Jung Cook

Sustentante

Q.F.B. José Guadalupe Becerril Vega

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Autónoma de México.
- A mi tutora, la Dra. Helgi Jung Cook por haberme guiado con tanta paciencia durante los últimos años, por compartir sus conocimientos conmigo y haberme apoyado en cada paso.
- A CONACyT por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado con número de becario 308049.
- A la Dra. Iliana González por todo el apoyo técnico a cada paso del desarrollo de esta tesis, por sus buenos consejos y por el apoyo que me brindó en todo momento.
- Al M. en C. César Augusto Rodríguez y al personal del biotero del INNN por su ayuda con la cirugía a los animales.
- A los miembros de mi jurado, la Dra. Raquel López, Dra. Adriana Ganem, Dra. Agnes Odilé, Dr. Francisco Hernández y la Dra. Blanca Rivero por todos sus comentarios que ayudaron a enriquecer y mejorar esta tesis.
- A mis padres y hermanos por confiar en mí y por todo el apoyo que me brindaron para que pudiera lograr mis objetivos.
- A mi segunda familia, Bere Álvarez, Caro Rivera, Juan Luis Gutiérrez, Libi Cabrera y Luis Alvarado, por ser mis confidentes y mis mejores amigos, por todos esos momentos especiales, por los consejos, por escucharme y ayudarme siempre.
- A la Profesora Ruth Martín por sus consejos y por apoyarme siempre con mis decisiones.

- A todos mis profesores, por darme las herramientas necesarias para ser un mejor profesionalista y una mejor persona.
- A las doctoras Susana Rojas, Nelly Castro, Francisca Palomares y la M. en C. Lourdes Mayet por sus consejos, apoyo y sugerencias durante la experimentación realizada.
- A mis amigos del laboratorio de Neuropsicofarmacología, por sus consejos y por hacer los días más alegres.
- A mis amigos del laboratorio 112, Ceci Meza, Marce Mirelle, Claudia Vences, Nidia Barragan, Ulises Sánchez, Sergio Soto y Brenda Evangelista por haber compartido tantos momentos conmigo.
- A todos mis amigos que han formado parte de mi vida durante todo este largo trayecto.

Este trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 112 del departamento de Farmacia en el conjunto E, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México y fue presentado como trabajo libre en el XLVIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas, con el título: Desarrollo y validación de un método por LC/MS para cuantificar MEDS, un nuevo antiparasitario

ÍNDICE GENERAL

Capítulo	Página
Índice General	i
Índice de tablas	iv
Índice de figuras	vi
Índice de diagramas	vii
Índice de abreviaturas	viii
1 Introducción	1
2 Antecedentes	2
2.1 <i>Taenia solium</i>	2
2.1.1 Ciclo biológico	3
2.2 Neurocisticercosis	4
2.2.1 Epidemiología	5
2.2.2 Manifestaciones clínicas	7
2.2.3 Diagnóstico	7
2.2.4 Tratamiento	9
2.3 Albendazol	10
2.3.1 Propiedades fisicoquímicas	10
2.3.2 Mecanismo de acción	11
2.3.3 Farmacocinética	11
2.4 Derivados del Carbendazim	13
2.4.1 Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad cisticida	13
2.4.2 Estudios de acoplamiento molecular	15
2.4.3 Evaluación hepatotóxica de MEDS	17
2.4.4 Propiedades fisicoquímicas del compuesto MEDS	17
2.5 Acoplamiento HPLC-MS/MS	18
2.6 Validación de métodos analíticos	22
3 Objetivos	25
3.1 Objetivo general	25
3.2 Objetivos particulares	25
4 Parte experimental	26
4.1 Materiales, equipos e instrumentos	26
4.1.1 Preparación de soluciones	26

4.1.2	Desarrollo y validación del método analítico	27
4.1.3	Estudio de farmacocinética	28
4.2	Preparación de soluciones	29
4.2.1	Soluciones generales	29
4.2.2	Soluciones Stock	30
4.2.3	Soluciones estándar	30
4.2.3.1	Soluciones estándar de MEDS	30
4.2.3.2	Soluciones estándar de SOALB	31
4.2.4	Curva de calibración	31
4.2.5	Puntos control	33
4.3	Desarrollo del método analítico	34
4.3.1	Detección en el espectrómetro de masas	34
4.3.2	Selección de la fase móvil y el estándar interno	35
4.3.3	Selección del disolvente de extracción	36
4.3.4	Optimización de la extracción	36
4.4	Validación del método analítico	37
4.4.1	Selectividad	37
4.4.2	Acarreo	37
4.4.3	Efecto de matriz	38
4.4.4	Recobro	38
4.4.5	Límite de cuantificación	38
4.4.6	Linealidad	38
4.4.7	Precisión	39
4.4.7.1	Repetibilidad	39
4.4.7.2	Precisión intermedia	39
4.4.8	Exactitud	39
4.4.9	Estabilidad	39
4.4.9.1	Estabilidad de la muestra procesada	40
4.4.9.2	Estabilidad en automuestreador	40
4.4.9.3	Estabilidad a largo plazo	40
4.4.9.4	Estabilidad de la solución Stock de MEDS 0.1 mg/mL	40
4.5	Estudio de farmacocinética	41
4.5.1	Formulación	41
4.5.2	Animales de experimentación	41

4.5.3	Diseño del estudio	41
4.5.4	Parámetros farmacocinéticos	42
4.6	Análisis estadístico	42
5	Resultados y discusión	43
5.1	Desarrollo del método analítico	43
5.1.1	Detección en el espectrómetro de masas	43
5.1.2	Selección de la fase móvil y el EI	44
5.1.3	Selección del disolvente de extracción	47
5.1.4	Optimización de la extracción	48
5.1.5	Condiciones cromatográficas	51
5.2	Validación del método analítico	53
5.2.1	Selectividad	53
5.2.2	Acarreo	54
5.2.3	Efecto de matriz	54
5.2.4	Recobro	55
5.2.5	Límite de cuantificación	56
5.2.6	Linealidad	56
5.2.7	Precisión y Exactitud	57
5.2.8	Estabilidad	58
5.3	Estudio de farmacocinética	59
6	Conclusiones	64
7	Perspectivas	65
8	Referencias	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1. Criterios diagnósticos y grados de certeza diagnóstica de NCC	8
Tabla 2. Estructura y resultados de actividad <i>in vitro</i> de derivados de carbendazim	14
Tabla 3. CE ₅₀ de los derivados de Carbendazim	15
Tabla 4. Energías de acoplamiento a la β -tubulina de <i>H. contonus</i> y <i>F. hepática</i>	15
Tabla 5. Actividad cisticida <i>in vivo</i> del compuesto MEDS y ABZ	16
Tabla 6. Actividad de las enzimas hepáticas posterior a un mes de tratamiento en ratones hembra BALB/c con cisticercosis	17
Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas del compuesto MEDS	18
Tabla 8. Consideraciones para el acoplamiento HPLC-MS	19
Tabla 9. Comparación de los requisitos de validación de la NOM 177 y la guía de la FDA	23
Tabla 10. Curva de calibración en plasma. Preparación de las soluciones parciales	31
Tabla 11. Curva de calibración en plasma. Preparación de las soluciones finales	32
Tabla 12. Curva de calibración en solución. Preparación de las soluciones parciales	32
Tabla 13. Curva de calibración en solución. Preparación de las soluciones finales	33
Tabla 14. Puntos control en plasma. Preparación de las soluciones parciales	33
Tabla 15. Puntos control en plasma. Preparación de las soluciones finales	33
Tabla 16. Puntos control en solución. Preparación de las soluciones parciales	34
Tabla 17. Puntos control en solución. Preparación de las soluciones parciales	34
Tabla 18. Factores a evaluar en el diseño factorial	37
Tabla 19. Condiciones para la fragmentación usadas en el modo MRM.	44
Tabla 20. Tiempos de retención logrados con cada fase móvil	45
Tabla 21. Efecto de matriz observado con los fármacos probados como EI	45
Tabla 22. ANOVA para recobro por disolvente	48
Tabla 23. Prueba de Tukey para recobro por disolvente	48
Tabla 24. Respuesta analítica de los blancos	53
Tabla 25. Respuesta de los blancos en la prueba de acarreo	54
Tabla 26. Porcentaje de efecto de matriz y FMN para cada tipo de blanco	55
Tabla 27. Recobro del SOALB y del MEDS en PCB y PCA	56
Tabla 28. Valores de m, b y r para las 6 curvas evaluadas para la linealidad.	57
Tabla 29. Porcentaje de desviación absoluta de la concentración calculada con respecto	

	a la concentración nominal de MEDS	57
Tabla 30.	Precisión del método desarrollado	58
Tabla 31.	Exactitud del método desarrollado	58
Tabla 32.	Porcentaje de la concentración obtenida respecto a la concentración nominal en la evaluación de la estabilidad de MEDS en diferentes condiciones	59
Tabla 33.	Concentración plasmática promedio de MEDS. (promedio \pm DE)	60
Tabla 34.	Parámetros farmacocinéticos de MEDS calculados.	61
Tabla 35.	Parámetros farmacocinéticos de ALB y SOALB (Wojnics, A., et al, 2013).	62
Tabla 36.	Parámetros farmacocinéticos de SOALB y MEDS tras una administración equimolar a ratas.	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
Figura 1.	Estructura de <i>Taenia solium</i>	2
Figura 2.	Huevo de <i>T. solium</i>	3
Figura 3.	Cisticerco de <i>T. solium</i>	3
Figura 4.	Ciclo biológico de <i>Taenia solium</i>	4
Figura 5.	Frecuencias anuales de pacientes con NCC hospitalizados (INNN, 1995-2009)	6
Figura 6.	Esquema para elección de tratamiento	9
Figura 7.	Estructura y valores de pKa del ABZ	11
Figura 8.	Metabolismo del Albendazol	12
Figura 9.	Estructura del Carbendazim	13
Figura 10.	Sitio de unión del SOALB y los compuestos MEDS, AOA1 y AOA70	16
Figura 11.	Proceso de ionización por electrospray.	20
Figura 12.	Analizador de cuadrupolo	21
Figura 13.	Analizador de trampa de iones	21
Figura 14.	Espectro de masas del MEDS	43
Figura 15.	Espectro de masas del SOALB	44
Figura 16.	Cromatogramas del PCM en solución con cada EI. (Pico azul: MEDS, Pico rojo: EI). A) Venlafaxina, B) SOALB, C) Carbamazepina	46
Figura 17.	Intensidad de fosfolípidos extraídos empleando diferentes técnicas a partir de muestras de plasma.	47
Figura 18.	Gráfica de probabilidad normal para MEDS	48
Figura 19.	Gráfica de probabilidad normal para SOALB	49
Figura 20.	Gráfico de superficie de respuesta estimada	50
Figura 21.	Cromatograma típico obtenido con el método desarrollado. A) MEDS, B) SOALB	52
Figura 22.	Cromatograma típico de muestra blanco. A) señal de MEDS, B) señal de EI	53
Figura 23.	Curva de calibración	56
Figura 24.	Perfil de concentración vs tiempo de MEDS después de la administración de una dosis de 20.86 mg/Kg. Cada punto representa promedio \pm DE (n = 5)	60

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama		Página.
Diagrama 1.	Preparación de la solución de adecuabilidad	30
Diagrama 2.	Procedimiento de extracción	36
Diagrama 3	Método de extracción desarrollado	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ABZ	Albendazol
ACN	Acetonitrilo
ALT	Alanino aminotransferasa
ANOVA	Análisis de varianza
APCI	Ionización química a presión atmosférica
API	Ionización a presión atmosférica
APPI	Fotoionización a presión atmosférica
AST	Aspartato aminotransferasa
ATF	Ácido trifluoroacético
AUC	Área bajo la curva del perfil de concentraciones plasmáticas en función del tiempo
b	Ordenada al origen
CBZ	Carbamazepina
CE	Energía de colisión
CE₅₀	Concentración efectiva 50
CE₉₀	Concentración efectiva 90
CID	Disociación inducida por colisión
C_{max}	Concentración plasmática máxima
CMC	Carboximetil celulosa
CV	Coeficiente de variación
CXP	Potencial a la salida de la celda de colisión
CYP	Citocromo P450
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Potencial de desagrupación
EI	Estándar interno
EITB	Del inglés: Enzyme-linked immunoelectrotransfer blot
ELISA	Del inglés: Enzyme-linked immunoabsorbent assay
ELL	Extracción líquido líquido
EP	Potencial de entrada
ESI	Electrospray
FAL	Fosfatasa alcalina
FDA	Del inglés: Food and drug administration

FM	Fase móvil
FMN	Factor de matriz normalizado
FMO	Flavin monooxigenasa
HPLC	Del inglés: High-performance liquid chromatography
IC	Intervalo de confianza
INNN	Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
LC	Cromatografía de líquidos
LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LSC	Límite superior de cuantificación
m	Pendiente
MEDS	{5-[(4-nitroencil)carbamoil]-1H-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo
MeOH	Metanol
MRM	Monitoreo de múltiples reacciones
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MTBE	Metil terbutil éter
NCC	Neurocisticercosis
OMS	Organización mundial de la salud
PC	Puntos control
PCA	Punto control alto
PCB	Punto control bajo
PCM	Punto control medio
Q	Cuadrupolo
r	Coeficiente de correlación
RM	Resonancia magnética
rpm	Revoluciones por minuto
SIM	Monitoreo selectivo de iones
SNC	Sistema nervioso central
SOALB	Sulfóxido de albendazol
SPE	Extracción en fase sólida
<i>T. solium</i>	<i>Taenia solium</i>
t_{1/2}	Tiempo de vida media
TC	Tomografía computarizada

t_{max}	Tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima
TMR	Tiempo medio de residencia
TOF	Analizador de tiempo de vuelo
UI	Unidades internacionales
VEN	Venlafaxina

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades ocasionadas por parásitos son responsables de una considerable morbilidad y mortalidad a nivel mundial, llegando a afectar a más de 500 millones de personas. La OMS considera que estas enfermedades están estrechamente relacionadas con la pobreza y con las condiciones higiénicas, socio-económicas y ambientales de las zonas tropicales. Una de estas enfermedades es la neurocisticercosis (NCC), la cual es la principal afección parasitaria del sistema nervioso central (SNC) y se distribuye ampliamente en África, Asia y América Latina (Sotelo, J., 2002).

Una revisión bibliográfica de los casos de neurocisticercosis reportados a nivel nacional indica que el valor de 2000 al 2010, fue de 500 pacientes, lo cual muestra que esta enfermedad sigue prevaleciendo en nuestro país. A pesar de que ese número no parece muy elevado, hay que tomar en cuenta que dicha cifra no muestra el número real de personas que padecen la enfermedad en el país (Fleury, A., 2012).

A la fecha, la quimioterapia sigue siendo el componente principal del tratamiento de esta enfermedad en las áreas endémicas. Sin embargo, las empresas farmacéuticas no invierten en la investigación de nuevos fármacos para tratar estos problemas de salud ya que en general sólo afectan a la población de bajos recursos. Es por esto que las universidades juegan un papel importante en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para estas enfermedades.

En los últimos años, en la Facultad de Química se han sintetizado nuevos compuestos antiparasitarios derivados del bencimidazol. Uno de ellos denominado MEDS, mostró ser activo contra cisticercos de *Taenia crassiseeps* en un modelo murino (Melchor, S., 2011), y presentó menos efectos tóxicos que el albendazol, por lo que se ha continuado con la investigación acerca de sus propiedades fisicoquímicas y farmacéuticas.

El aporte del presente trabajo es el desarrollo de un método analítico para cuantificar MEDS en plasma y el estudio farmacocinético de esta nueva molécula en ratas.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Taenia solium*

Taenia solium (*T. solium*) es un helminto capaz de producir dos enfermedades en los humanos. Cuando está en su fase adulta causa la teniasis, mientras que en su fase de cisticerco causa la cisticercosis (Meza, A., 2002). Este helminto pertenece a la clase *Cestoda*, subclase *Eucestoda*, orden *Cyclophyllidea* y familia *Taeniidae*. Todos los organismos de esta familia tienen una cabeza o escólex que sirve para anclarse a la pared intestinal, y un cuerpo alargado y segmentado (Singh, G., 2002). El escólex, del tamaño de una cabeza de alfiler, está formado por cuatro ventosas y un rostelo con una doble corona de ganchos. Por otro lado, el cuerpo mide entre 3 y 4 metros y se divide en proglótidos, cada uno de los cuales es una unidad autofecundante que produce huevos (Cabello, R., 2007). Dicha estructura se muestra gráficamente en la figura 1.

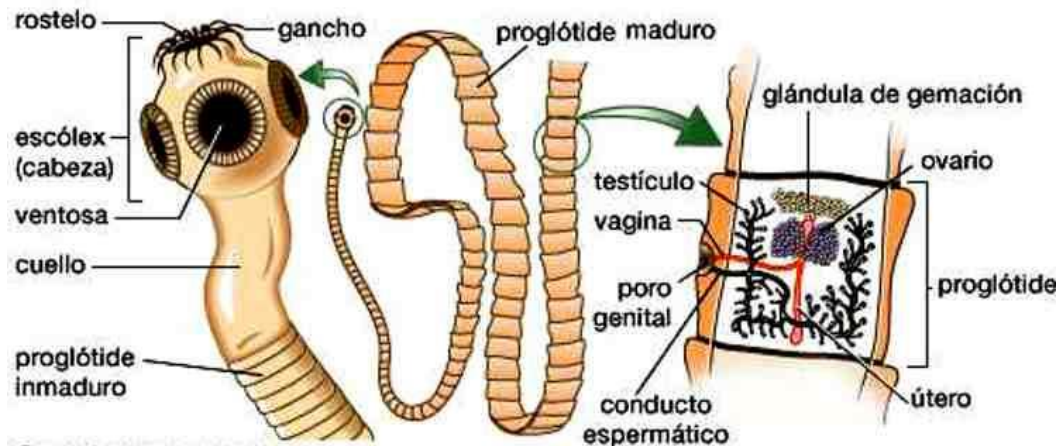


Figura 1. Estructura de *Taenia solium*

Los proglótidos más cercanos al escólex son inmaduros, mientras los más alejados son maduros sexualmente y producen alrededor de 50,000 a 60,000 huevos. Dichos huevos, mostrados en la figura 2, son esféricos, miden entre 30 y 45 μm y poseen una membrana gruesa alrededor, la cual protege al embrión hexacanto, llamado así por poseer 6 ganchos (Meza, A., 2002 y Singh, G., 2002).

Por otro lado, la forma larvaria de la *T. solium* son los cisticercos, los cuales se presentan en la figura 3. Estos son vesículas blanquecinas nacaradas, de 0.5 -1 cm de diámetro y se forman de dos partes: la pared vesicular y el escólex. Este último tiene una morfología parecida al de la tenia adulta (Cabello, R., 2007 y Sotelo, J., 2002) mientras que la pared

vesicular sirve de protección y para absorber nutrientes y eliminar metabolitos. Estos cisticercos se encuentran principalmente en el hospedero intermediario que es el cerdo, pero también llegan a afectar al humano causándole cisticercosis (Singh, G., 2002)



Figura 2. Huevo de *T. solium*

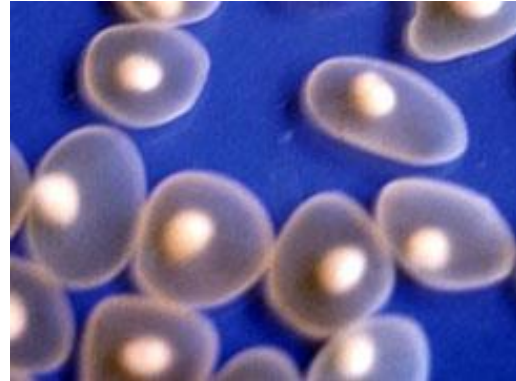


Figura 3. Cisticerco de *T. solium*

2.1.1 Ciclo biológico

La *T. solium* adulta habita en el intestino de los humanos, donde se ancla gracias a su escólex. Cada día, unos pocos proglótidos liberan una gran cantidad de huevos que son expulsados en las heces humanas. En los lugares donde existe una deficiente manera de eliminar las heces (por ejemplo fecalismo al aire libre), los cerdos pueden comerlas e infectarse así con huevos de *T. solium*, transformándose en huésped intermediario (Sotelo, J., 2002).

Una vez en el intestino del cerdo, las enzimas pancreáticas y sales biliares rompen el huevo y hacen que eclusione. Los embriones activados se adhieren momentáneamente a la pared intestinal por medio de sus seis ganchos y liberan enzimas hidrolíticas que destruyen el tejido y logran atravesar el intestino llegando a la circulación. Una vez ahí, se distribuyen y se alojan en cualquier parte del organismo, siendo los órganos más comunmente afectados el músculo estriado, el sistema nervioso central (SNC), ojos, tejido graso subcutáneo y corazón. Una vez alojados comienzan a desarrollarse a cisticercos en un promedio de 3 a 4 meses, generando la cisticercosis porcina (Meza, A., 2002).

El ciclo se completa cuando los humanos comen carne de cerdo mal cocida y que está parasitada con cisticercos. Una vez que estos llegan al intestino, gracias a las enzimas y la bilis, el cisticerco invagina y se ancla a la pared intestinal con el escólex. Estando ahí se desarrolla hasta alcanzar su forma adulta en un tiempo de cuatro meses (Meza, A., 2002).

Cuando el ser humano ingiere huevos de *T. solium* se convierte en hospedero intermediario y adquiere cisticercosis humana. Esto puede ocurrir por la ingestión de alimentos o agua infectados o por autoinfección mediante la vía ano-mano-boca. El proceso por el cual los cisticercos llegan a los tejidos humanos es el mismo que para el caso del cerdo (Meza, A., 2002). Los tejidos más afectados son el músculo estriado y el cerebro (Imirizaldu, L., 2004). Todo el ciclo se encuentra esquematizado en la figura 4.

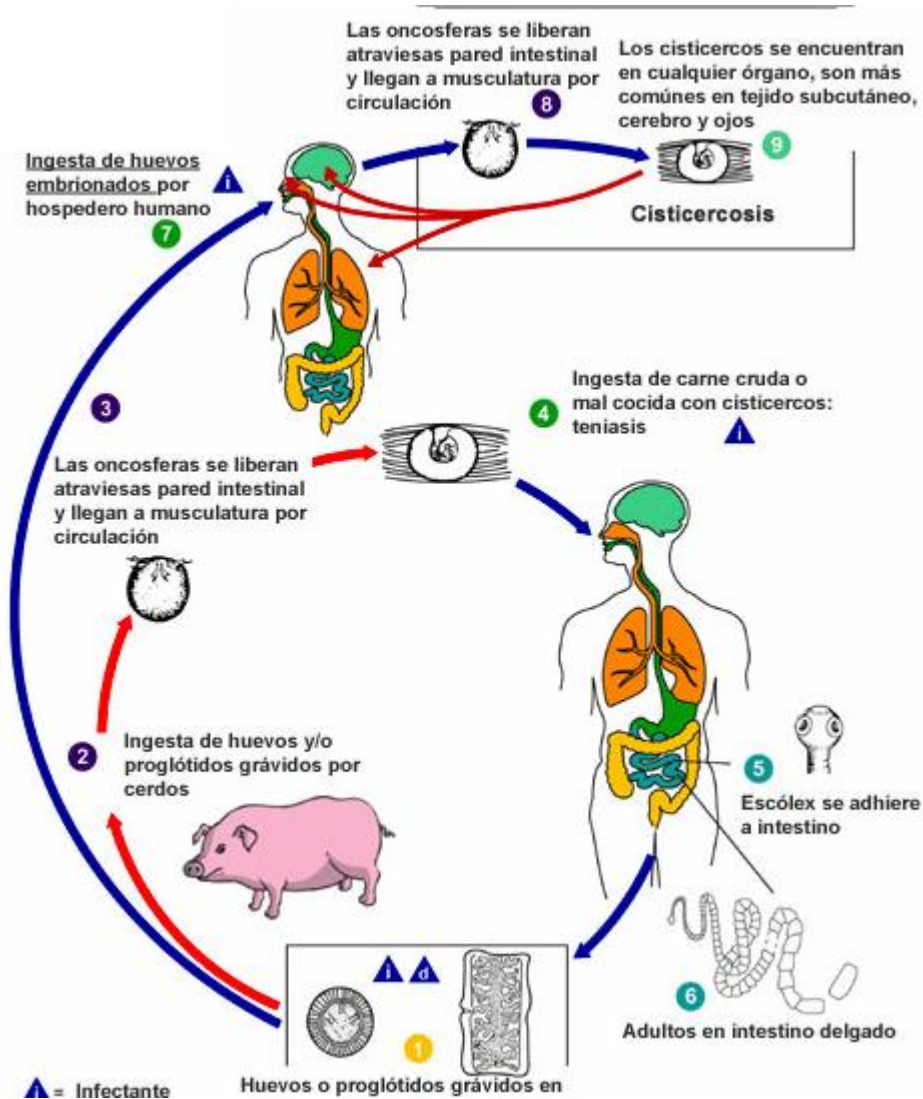


Figura 4. Ciclo biológico de *Taenia solium*

2.2 NEUROCISTICERCOSIS

La neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad pleomórfica que se adquiere al ingerir huevecillos de *Taenia solium* (Del Bruto, O.H., 2005). Es la principal afección parasitaria

del SNC y la principal causa de epilepsia en países endémicos. Esta enfermedad puede encontrarse en dos formas distintas: inactiva o activa (Imirizaldu, L., 2004).

La NCC inactiva se presenta cuando ya no hay parásitos viables o en degeneración. Por otro lado, la NCC activa ocurre cuando existe la presencia de parásitos viables y puede dividirse a su vez en varios subtipos de acuerdo a la zona del SNC que esté infectada. Si los cisticercos están en el parénquima del cerebro se habla de cisticercosis parenquimatosa, mientras que si se localizan en el espacio subaracnoideo se tiene la forma subaracnoidea. Otras formas son la intraventricular y la espinal, siendo estas últimas menos frecuentes (Imirizaldu, L., 2004).

Las manifestaciones clínicas varían en cada forma de la enfermedad dependiendo de la localización y del estadio de las lesiones. Los cisticercos pasan por cuatro estadios en su ciclo vital: vesicular, coloidal, granular y calcificado (Del Bruto, O.H., 2005). El estadio vesicular es la forma viable del parásito y genera cambios inflamatorios mínimos. Un cisticerco puede permanecer en esa forma por años o pasar a la forma coloidal debido a un ataque inmunológico del paciente en el que las células inflamatorias rodean al cisticerco. Cuando se colapsa la cavidad del cisticerco se llega a la forma granular, la cual lleva posteriormente al estadio calcificado (Imirizaldu, L., 2004).

2.2.1 Epidemiología

La NCC es un problema de salud en países de Asia, África y América Latina (Sotelo, J., 2002). Sin embargo, ahora es considerada como una enfermedad emergente en países desarrollados debido al aumento en la migración (Wallin, M., 2004 y Ruiz, S., 2011). Esto ha ocasionado un incremento en la prevalencia de esta enfermedad en países de Europa y Estados Unidos donde, hasta hace unas décadas, era muy inusual encontrarla (Fernández, E. R., 2006).

En México se encontraron reportados en la literatura 500 casos de NCC humana del año 2000 al 2010, así como una alta prevalencia de cisticercosis porcina en algunos estados de la república. A pesar de que ese número no parece muy elevado, hay que tomar en cuenta que dicha cifra no muestra el dato real de casos en el país. Esto porque solo unos pocos casos son publicados, además de que las personas de escasos recursos que llegan a padecer la enfermedad no siempre son diagnosticados dado el costo de las tecnologías empleadas para dicho fin (Fleury, A., 2012).

En un estudio hecho por Velasquez, L., *et al* en 2004 se encontró que en el INNN se diagnosticaron en promedio 55 casos de NCC del año de 1995 al 2001. El grupo de edad

que tuvo mayor incidencia fue de 20-39 años. De manera paralela, Fleury, A., *et al*, compararon los casos de NCC atendidos en el mismo hospital en 1994 y 2004, encontrando que no hay diferencia significativa entre el número de pacientes ni en su perfil general en los dos años. Las únicas diferencias encontradas fueron que aumentó el número de personas que padecían la enfermedad en la ciudad de México y que hubo una disminución en la gravedad de los pacientes diagnosticados (Fleury, A., 2010).

Asimismo, se analizó la frecuencia con que los pacientes con NCC eran hospitalizados en los servicios de cirugía, neurología y psiquiatría en el periodo de 1995 a 2009 encontrando los resultados que se muestran en la figura 5 en donde se observa que la frecuencia de hospitalización en neurología se mantuvo estable, mientras que la hospitalización en cirugía disminuyó, lo cual puede estar relacionado al diagnóstico temprano de la enfermedad (Fleury, A., 2010).

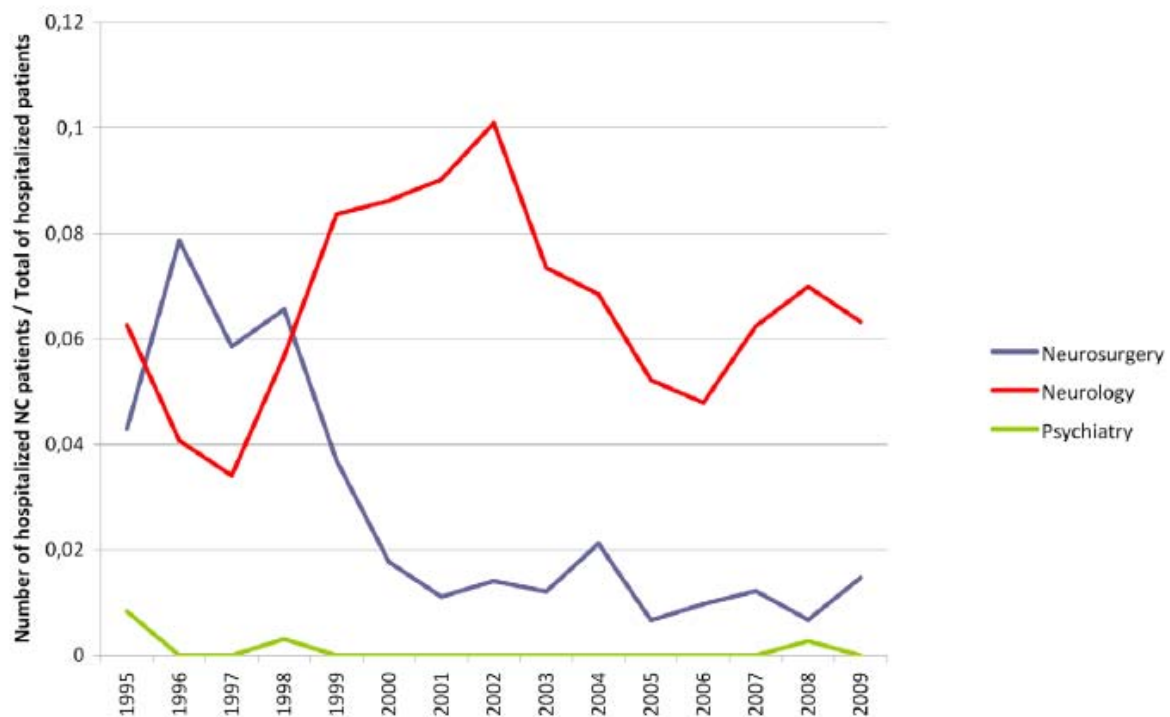


Figura 5. Frecuencias anuales de pacientes con NCC hospitalizados (INNN, 1995-2009)

El último dato encontrado sobre reportes de NCC en México fue en un estudio publicado en 2014 en el que se analizó el periodo de 2005 a 2011 donde se reporta que en el INNN esta enfermedad ocupa el tercer lugar de las causas de atención médica sujetas a vigilancia epidemiológica con 145 casos. Esto muestra que la enfermedad se está

controlando aún más, dado el mayor acceso a su diagnóstico, pero que aún no es un problema de salud erradicado (Velázquez, L., 2014).

2.2.2 Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas de la NCC dependen de la localización, el número y el estadio de los cisticercos, lo cual hace que sea una enfermedad pleomórfica (Sotelo, J., 2002 y Del Bruto, O.H., 2005). En el caso de la forma inactiva de la enfermedad, algunos pacientes pueden presentar hidrocefalia. Para los otros tipos, el principal síntoma es la epilepsia, sobre todo para la forma parenquimatosa, presentándose en un 50-80% de los casos. Otro signo común de todas las formas de la NCC es la cefalea, la cual puede ser hem craneal o bilateral (Imirizaldu, L., 2004).

En el caso de que los cisticercos se localicen en áreas cerebrales expresivas pueden aparecer signos neurológicos focales como déficit motor, piramidalismo, ataxia cerebelosa, etc. Si los parásitos infectan de forma masiva el parénquima pueden ocasionar encefalitis cisticercosa, la cual es una inflamación intensa que lleva a deterioro de conciencia, convulsiones, disminución de agudeza visual, cefalea y vómitos. Esto último ocurre comúnmente en niños y mujeres jóvenes (Imirizaldu, L., 2004 y Sotelo, J., 2002).

Por otro lado, en la forma subaracnoidea e intraventricular suele presentarse hidrocefalia cuando los quistes obstruyen permanentemente el flujo del líquido cefalorraquídeo (LCR). En otras ocasiones la obstrucción es intermitente y se relaciona con los movimientos de la cabeza, generando pérdidas de conciencia intermitentes (Imirizaldu, L., 2004).

2.2.3 Diagnóstico

Para establecer un diagnóstico adecuado se debe conjuntar la información epidemiológica, clínica, del inmunodiagnóstico y de los estudios de neuroimagen (Imirizaldu, L., 2004). Existen algunos criterios establecidos por Del Bruto, O. H., los cuales ayudan al diagnóstico correcto y certero de la enfermedad; estos se muestran en la tabla 1.

Los estudios de neuroimagen que se emplean son la resonancia magnética (RM) y la tomografía computarizada (TC). En primer lugar se emplea la TC, la cual permite detectar calcificaciones. En caso de que la TC sea normal, se utiliza la RM que es mejor para poder determinar el estadio de los quistes. Con excepción de la observación del escolex, otros hallazgos por estas técnicas no son patognómicos (Sotelo, J., 2002 y Imirizaldu, L., 2004), por lo que se necesitan otros estudios para el diagnóstico correcto, como las pruebas inmunológicas.

Tabla 1. Criterios diagnósticos y grados de certeza diagnóstica de NCC (Del Bruto, O. H, 2005)

Criterios diagnósticos	
Criterios absolutos	Demostración histológica del parásito en material de biopsia
	Presencia de lesiones quísticas con escólex en TC o RM
	Visualización del parásito por oftalmoscopia
Criterios mayores	Lesiones altamente sugestivas de NCC en estudios de neuroimagen
	Inmunoblot positivo para anticuerpos anticisticercos en sangre
	Resolución de lesiones quísticas con albendazol o prazicuantel
	Resolución espontánea de lesiones anulares hipercaptantes únicas
Criterios menores	Lesiones compatibles con NCC en estudios de neuroimagen
	Manifestaciones clínicas sugestivas de NCC
	Presencia de cisticercos fuera del SNC
	ELISA positivo para detección de antígenos o anticuerpos de cisticercos en líquido cefalorraquídeo (LCR).
Criterios epidemiológicos	Existencia de un contacto doméstico infectado con <i>T. solium</i>
	Individuos que residan o provengan de áreas endémicas
	Historia de viajes frecuentes hacia áreas endémicas
Grados de certeza diagnóstica	
Diagnóstico definitivo	*Presencia de un criterio absoluto *Presencia de dos criterios mayores, más uno menor y uno epidemiológico
Diagnóstico probable	*Presencia de un criterio mayor más dos menores *Presencia de un criterio mayor, más un menor y un epidemiológico *Presencia de tres criterios menores más uno epidemiológico

Las pruebas para detectar anticuerpos anticisticercos son ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) y EITB (Enzyme-Linked immunoelectrotransfer Blot). La primera tiene muchas reacciones cruzadas en suero con anticuerpos contra otros cestodos, por lo que debe usarse en LCR. En cuanto al segundo, es más específico y sensible, pero se debe tener en cuenta que es positivo si la persona sufre teniasis o ha tenido contacto con el parásito sin infectarse (Imirizaldu, L., 2004). A pesar de que estas pruebas deberían ser específicas para la fase larvaria del parásito y para su localización, esto no es así (Carpio, A., 2013). Es por esto que sirven como complemento para los estudios de neuroimagen,

pero nunca deben ser usados de forma aislada para descartar o confirmar el diagnóstico de NCC (Imirizaldu, L., 2004).

2.2.4 Tratamiento

El tratamiento de la NCC debe ser individualizado dependiendo la localización, número y viabilidad de los parásitos (Carpio, A., 2013). El tratamiento de primera elección es el farmacológico que incluye medicamentos cisticidas y fármacos para aliviar los síntomas. En segundo lugar se encuentra la cirugía, la cual se recomienda cuando el tratamiento cisticida no funciona o cuando se presenta hipertensión intracraneal grave, quistes que obstruyan el flujo de LCR, hidrocefalia, compresión medular por cisticercosis espinal (Imirizaldu, L., 2004). Un esquema para elección del tratamiento es el presentado en la figura 6, el cual fue desarrollado por Carpio, *et al* (2013)

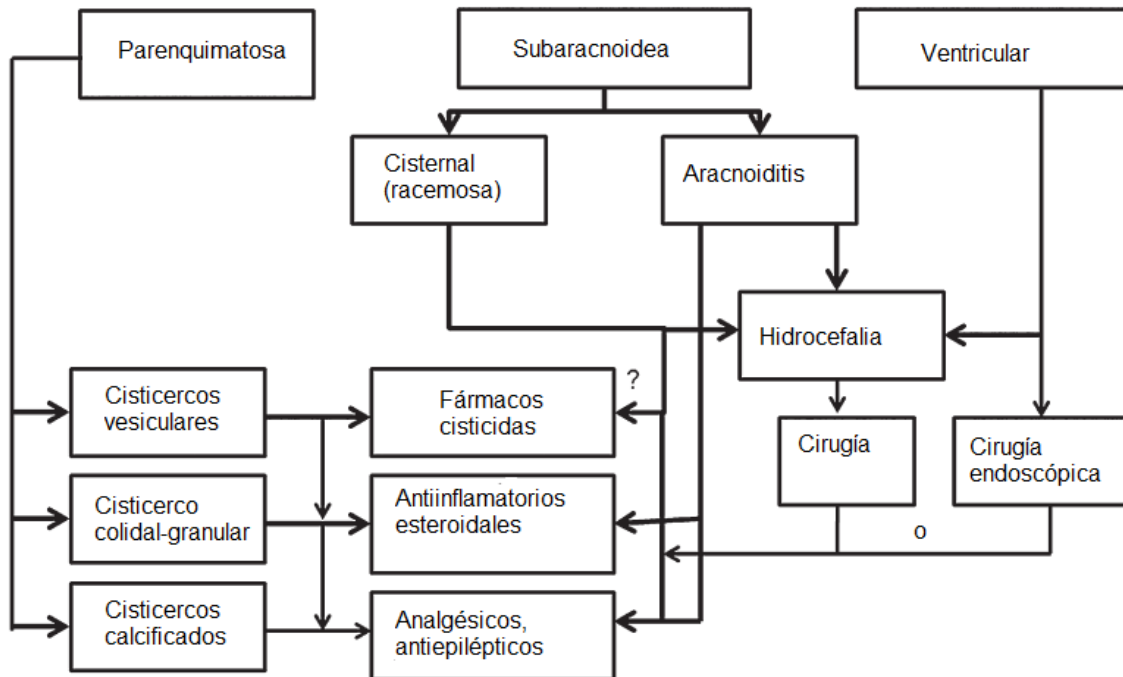


Figura 6. Esquema para elección de tratamiento

El tratamiento sintomático depende de las manifestaciones clínicas y puede incluir antiepilépticos, manitol para tratar presión intracraneal alta, analgésicos para el dolor de cabeza y corticosteroides para disminuir la inflamación (Carpio, et al, 2013). Aunado a lo anterior, cuando los cisticercos están en forma vesicular en el parénquima cerebral o en la zona subaracnoidea, se deben administrar fármacos cisticidas (figura 6), siendo los más utilizados praziquantel y albendazol (Imirizaldu, L., 2004).

Existen algunas formas de NCC que no pueden ser tratadas con dichos medicamentos, como la encefalitis cisticercosa o los casos con cisticercos calcificados. De igual forma, los pacientes que sufren hidrocefalia pueden recibir tratamiento una vez que se resuelve ésta a través de una derivación (Imirizaldu, L., 2004).

El praziquantel ha estado disponible en el mercado desde 1980 (Jung, H., 2012). Normalmente se administra a dosis de 50 mg/kg/día durante 15 días, logrando una destrucción del 60-70 % de los cisticercos. Su concentración plasmática disminuye en un 50% al usarse en conjunto con corticosteroides. Asimismo, disminuye las concentraciones plasmáticas de fenitoína y carbamazepina (Imirizaldu, L., 2004 y Del Bruto, O. H., 2005).

Mientras tanto, el albendazol se administra a dosis de 15 mg/kg/día por 8 días, generando la muerte del 75-90% de los parásitos. Este último presenta algunas ventajas frente al praziquantel ya que es capaz de destruir quistes subaracnoideos y no interacciona con fármacos antiepilépticos o con corticosteroides (Imirizaldu, L., 2004 y Sotelo, J, 2002).

Desde la introducción de estos fármacos cisticidas, el pronóstico de los pacientes ha mejorado significativamente. Sin embargo, los resultados de los estudios iniciales generaron escepticismo acerca de si en verdad dichos medicamentos cambiaban el curso natural de la enfermedad (Sotelo, J, 2002).

Es por esto que en 2006 Del Bruto, O. H., *et al* hicieron un meta-análisis de estudios aleatorizados para evaluar la eficacia de praziquantel y albendazol. En dicho estudio encontraron que ambos fármacos generan una reducción estadísticamente significativa en el número de lesiones, así como una disminución en las crisis convulsivas. Asimismo, concluyeron que hay una superioridad del albendazol sobre el praziquantel (Del Bruto, O. H, 2006).

2.3 ALBENDAZOL

El albendazol (ABZ) es un antihelmíntico de amplio espectro que es activo sobre varios parásitos intestinales. Los estudios para su uso en humanos iniciaron en 1979. Para 1987, Escobedo *et al* demostraron que este fármaco es efectivo para el tratamiento de la NCC. Hoy en día es el fármaco de elección para dicha enfermedad dada su mayor efectividad y su bajo costo.

2.3.1 Propiedades fisicoquímicas

El ABZ es un fármaco con baja solubilidad acuosa y con un valor de log P de 2.7 (Drug Bank, 2015). Este fármaco tiene dos valores de pKa, los cuales se muestran en la figura 7 junto con su estructura química (Jung, H., 1998).

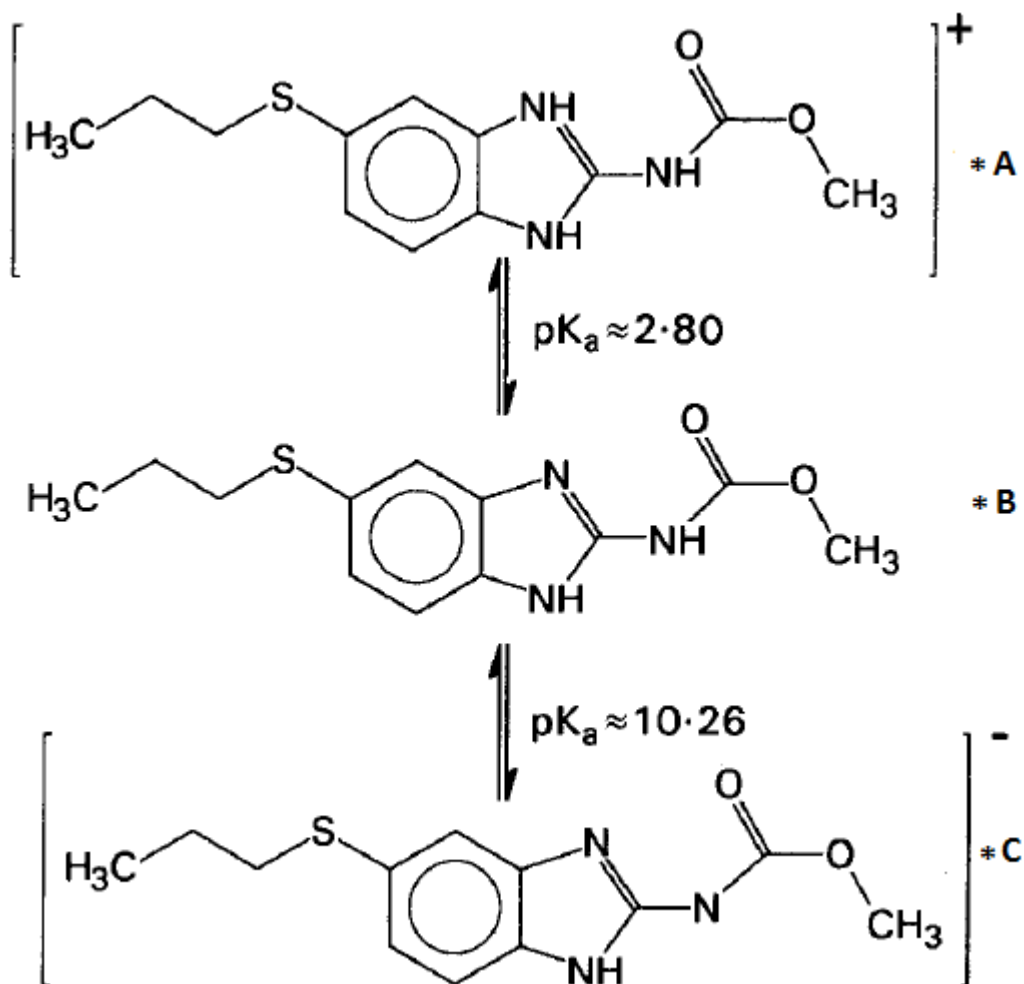


Figura 7. Estructura y valores de pKa del ABZ. En la estructura A el ABZ está ganando un protón en un nitrógeno básico, mientras que en la estructura C está perdiendo un protón ácido.

2.3.2 Mecanismo de acción

El principal modo de acción del ABZ es causar alteraciones en el tegumento y las células intestinales del parásito mediante su unión a la tubulina en el sitio sensible a colchicina, inhibiendo su polimerización o su ensamblaje en los microtúbulos. Esto genera fallas en el

metabolismo del parásito, incluyendo una disminución en la absorción de glucosa, concluyendo en su muerte (Jung, H., 2012 y DrugBank).

2.3.3 Farmacocinética

La absorción del albendazol en el tracto gastrointestinal es baja y errática debido a su baja solubilidad. La mayor parte se absorbe en el estómago donde se encuentra más soluble debido al pH bajo (Jung, H., 1998). Una vez que llega a la circulación, sufre un extenso metabolismo de primer paso hepático a través de las enzimas flavin mono-oxigenasas (FMO) y el citocromo P450, principalmente el CYP 3A4. El metabolito obtenido es el sulfóxido de albendazol (SOALB), el cual posee la actividad antihelmíntica. Posteriormente, el SOALB se oxida mediante el mismo citocromo produciendo la sulfona de albendazol, la cual es inactiva (Jung, H., 2012). Las estructuras de los metabolitos se muestran en la figura 8.

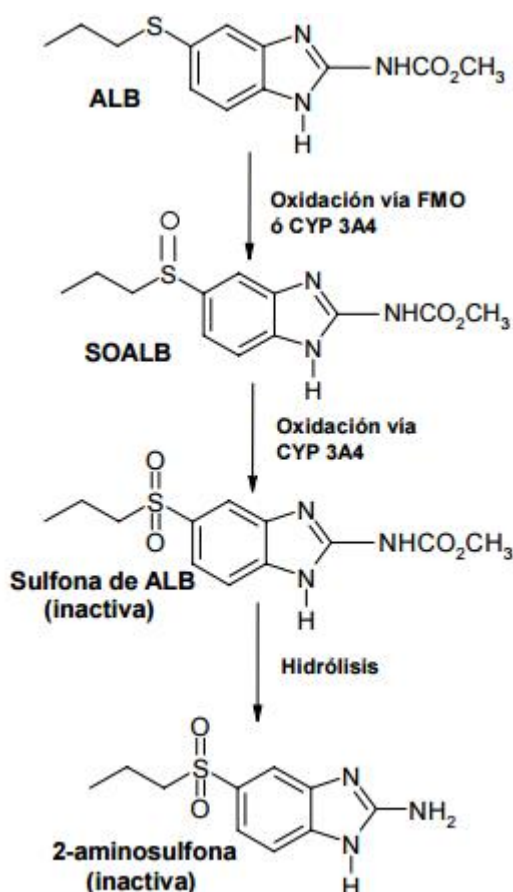


Figura 8. Metabolismo del albendazol

El albendazol se une altamente a proteínas plasmáticas (89-92%), mientras que el SOALB se une en menor medida (62-77%). Además, el SOALB permea a través de la barrera hematoencefálica, por lo que se encuentran altas concentraciones en líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, existe gran variabilidad interindividual en los niveles en líquido cefalorraquídeo, que podría estar relacionada a los problemas en la biodisponibilidad del albendazol. (Jung, H., 2012). El tiempo de vida media en humanos oscila entre 8-12 h. (Fleury, A., 2008).

2.4 DERIVADOS DE CARBENDAZIM

A pesar de que se ha demostrado la eficacia cisticida del albendazol y praziquantel, estos fármacos presentan algunas desventajas. En el caso del praziquantel, tiene menor eficacia que el albendazol y tiene varias interacciones con los medicamentos usados para tratamiento sintomático de la enfermedad (Imirizaldu, L., 2004). En el caso del albendazol, su alta variabilidad en las concentraciones plasmáticas debido a su baja solubilidad, genera fallas en el tratamiento en algunos pacientes (Jung, H., 2012).

Es por este motivo que es importante buscar nuevos tratamientos para esta enfermedad. Sin embargo, las empresas farmacéuticas no invierten en la investigación de nuevos fármacos para estos problemas de salud ya que en general sólo afectan a la población de bajos recursos. De esta manera las universidades juegan un papel importante en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para estas enfermedades.

En los últimos años, en el departamento de Farmacia de la Facultad de Química se ha llevado a cabo la síntesis de nuevos compuestos con posible actividad antiparasitaria. Este heterociclo nitrogenado es uno de los más importantes para la actividad antihelmíntica. Su popularidad comenzó en 1961, cuando se descubrió al tiabendazol como antiparasitario de amplio espectro (Campbell, W., 1986).

El compuesto benzimidazólico del cual deriva el albendazol es el carbendazim (Figura 9), por lo cual se tomó como núcleo para sintetizar una serie de derivados (tabla 2) a los que se les realizaron los estudios que se presentan a continuación (Melchor, S. 2011 y Juárez, V., 2011).

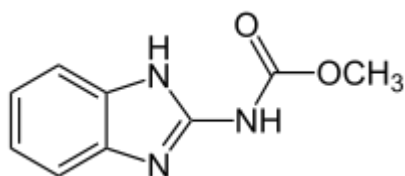
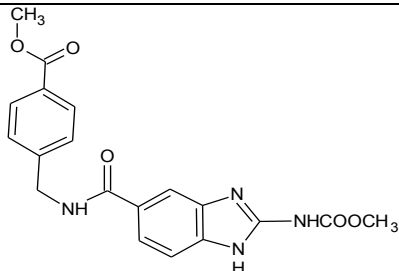
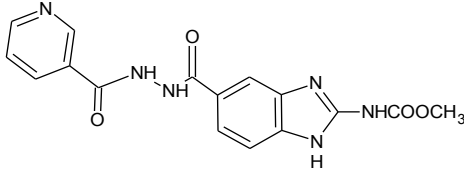
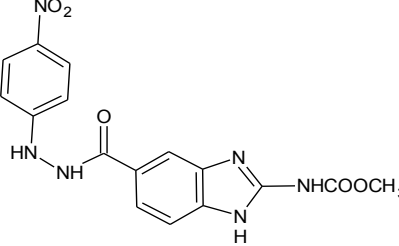
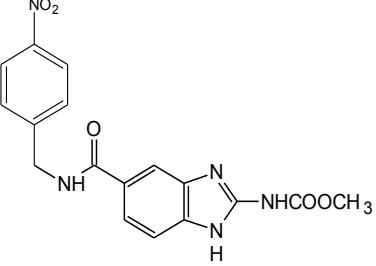
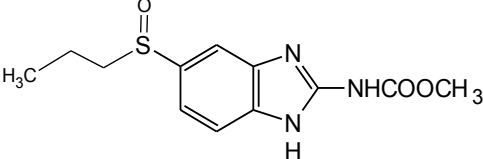


Figura 9. Estructura del carbendazim

2.4.1 Evaluación *in vitro* de la actividad cisticida

La evaluación *in vitro* se llevó a cabo en un modelo de *Taenia crassiceps* cepa ORF. Las moléculas se evaluaron a 3 concentraciones que representan la concentración efectiva 50 (CE₅₀), 90 (CE₉₀) y 10 veces la CE₅₀ de SOALB en ese modelo y son: 0.28, 1.7 y 2.8 μM, respectivamente. Se evaluó la mortalidad de los cisticercos en función del tiempo por 12 días. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Estructura y resultados de actividad *in vitro* de derivados de carbendazim

Clave	Estructura	% Mortalidad ± DE		
		0.28 μM	1.7 μM	2.8 μM
AOA1		0	10.5 ± 2.1	26 ± 2.8
AOA12		0	9.3 ± 1	22.5 ± 3.5
AOA70		0	9 ± 1.4	32 ± 22.6
MEDS		0	80 ± 2.1	100
SOALB		13 ± 2.8*	76 ± 11.3*	100

--	--	--	--	--

Como se observa en la tabla 2, el compuesto MEDS presentó una actividad similar a la del SOALB. Posteriormente se determinó la CE_{50} de los compuestos, obteniendo los resultados que se muestran en la tabla 3. En ella se puede ver que los compuestos de la serie AOA son menos potentes que el SOALB, pero el MEDS presentó una potencia similar al fármaco de referencia (Juarez, V., 2011).

Tabla 3. CE_{50} de los derivados de carbendazim

Análogo	CE_{50} (μM)	IC 95% (μM)
MEDS	1.02	0.21 - 1.82
AOA70	5.07	4.47 - 5.77
AOA12	7.35	4.79 - 9.73
AOA1	9.32	7.25-12.85
SOALB	0.55	0.47 - 0.62

2.4.2 Estudio de acoplamiento molecular

Se sabe que los bencimidazoles ejercen su efecto farmacológico al unirse a la β -tubulina de los helmintos. Por esta razón se llevó a cabo un estudio de acoplamiento molecular de los compuestos sintetizados en un modelo de β -tubulina de *H. contonius* y *F. hepatica*. Dicho estudio se realizó con el programa *Autodock 4.2*. Las energías de acoplamiento de los conformeros más estables se muestran en la tabla 4 (Melchor, S., 2011).

Tabla 4. Energías de acoplamiento a la β -tubulina de *H. contonius* y *F. hepatica*

Compuesto	Energía de acoplamiento (Kcal/mol)
SOALB	-8.32
AOA1	-5.68
AOA70	-7.59
MEDS	-7.58

Como se puede notar, los 3 compuestos analizados mostraron afinidad por el sitio de unión del SOALB a la tubulina, ya que los valores negativos indican que la unión es un proceso

favorecido. Asimismo, al observar la figura 10 se observa que los 3 compuestos cumplen con las características necesarias para acoplarse en el mismo sitio que el SOALB y que se alinean de manera similar (Melchor, S., 2011).

De esta manera se comprueba que el mecanismo por el cual presentan actividad contra cisticercos puede ser el mismo que el descrito para el SOALB. Esto sumado a la buena actividad cisticida *in vitro*, fue el motivo por el cual se llevó a cabo la evaluación de su eficacia *in vivo* en un modelo murino de *T. crassiceps*.

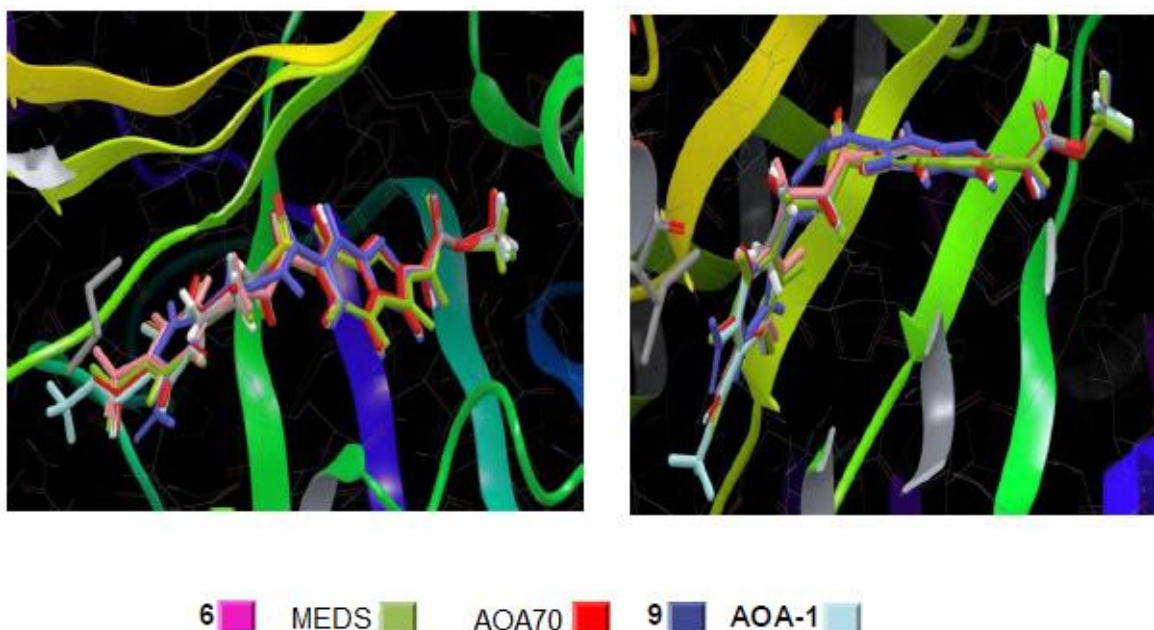


Figura 10. Sitio de unión del SOALB y los compuestos MEDS, AOA1 y AOA70 (Melchor, S., 2011)

La evaluación *in vivo* en el modelo murino se llevó a cabo empleando una formulación de MEDS o albendazol, en carboximetilcelulosa 0.5% y una formulación control. Las dosis administradas por vía oral fueron 50 y 70 mg/kg para ABZ y MEDS, respectivamente. Los compuestos se administraron durante 20 días, después de los cuales se sacrificó a los animales y se hizo el conteo de los cisticercos. Los resultados obtenidos se encuentran en la tabla 5.

Tabla 5. Actividad cisticida *in vivo* del compuesto MEDS y ABZ

Compuesto	Número de animales tratados	Conteo de parásitos promedio	Porcentaje de reducción de carga parasitaria %	%CV
-----------	-----------------------------	------------------------------	--	-----

Albendazol	9	230.6	47.16	21.11
MEDS	9	216.56	50.39	8.58
Grupo control	12	436.5		16.57

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la eficacia del ABZ y el MEDS. Durante el estudio todos los animales tratados con MEDS sobrevivieron y tras la autopsia no se encontraron signos de alteración en los órganos internos. Asimismo, su ingesta de alimento fue normal y ganaron peso de la misma manera que el grupo control. En contraste, los animales tratados con ABZ mantuvieron su peso corporal constante y algunos presentaron fatiga e hipersensibilidad al tacto (Juarez, V., 2011). Para complementar estos datos que indican toxicidad, se hicieron pruebas hepáticas a los animales tratados con MEDS.

2.4.3 Evaluación hepatotóxica de MEDS

Dado que durante el tratamiento con albendazol se puede presentar hepatotoxicidad (Sotelo, J., 1998), se consideró importante realizar esta prueba. Para ello, se administró el MEDS o ABZ durante 30 días a ratones. El último día se extrajo sangre y se determinó la actividad de 3 enzimas involucradas en la función hepática: fosfatasa alcalina (FAL), aspartato aminotransferasa (AST) y alanino aminotransferasa (ALT).

Los resultados en la tabla 6 muestran que el MEDS es menos hepatotóxico que el ABZ, ya que la actividad de las transaminasas fue menor en el tratamiento con el fármaco de prueba que con la referencia (Juarez, V., 2011). Debido a estas ventajas es que se decidió seguir con la evaluación biofarmacéutica del compuesto MEDS.

Tabla 6. Actividad de las enzimas hepáticas posterior a un mes de tratamiento en ratones hembra BALB/c con cisticercosis

<i>Tratamiento</i>	<i>AST (U/L)</i>	<i>ALT (U/L)</i>	<i>FAL (U/L)</i>
MEDS	215.5	70.8 ^c	72.0
Albendazol	835.5 ^a	355.7 ^a	87.8
Control	211.0 ^b	37 ^b	108

a $p < 0.05$, MEDS-I vs Albendazol

b $p < 0.05$ Albendazol vs Control

c $P < 0.05$ MEDS-I vs Control

2.4.4 Propiedades fisicoquímicas del compuesto MEDS

Además de la evaluación farmacológica y toxicológica, se ha determinado también el CLogP y el pKa del compuesto MEDS, los cuales se enlistan en la tabla 7, junto con su masa molar y su solubilidad en algunos disolventes.

Nombre químico: {5-[(4-nitroencil)carbamoil]-1H-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo

Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas del compuesto MEDS

Disolvente	Solubilidad (mg/mL)
DMSO	3.33
Ácido trifluoracético (ATF) 2% en MeOH	0.68
Diclorometano	0.34
Éter dietílico	0.16
Cloroformo	0.14
Acetato de etilo	0.13
Benceno	0.12
Isopropanol	0.08
Metanol	0.06
n-hexano	0.05
Agua	< 0.01
Masa molar	269.33 g/mol
pKa₁	3.32
pKa₂	9.21
cLogP (teórico)	1.98

2.5 ACOPLAMIENTO HPLC-MS/MS

Para poder llevar a cabo estudios farmacocinéticos es necesario contar con un método analítico validado para cuantificar el fármaco en la matriz biológica deseada. Una técnica muy utilizada y que sirve para análisis cuantitativos en muestras complejas es la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Dicha técnica analítica permite separar y cuantificar compuestos que se encuentran a bajas concentraciones dentro de una matriz compleja como lo es el plasma.

La separación se lleva a cabo debido a las diferentes afinidades que presentan los analitos por las fases que componen a la cromatografía. La fase estacionaria más utilizada es la fase químicamente enlazada, la cual consiste en cadenas hidrocarbonadas unidas a partículas de sílice de diámetro micrométrico. Por otro lado, la fase móvil es una mezcla de disolventes de polaridad opuesta a la de la fase estacionaria.

Una vez que se logra la separación cromatográfica es necesario contar con un sistema de detección de los analitos. Existen diferentes detectores que pueden acoplarse al cromatógrafo de líquidos, uno de los cuales es el detector de masas. La espectrometría de masas es altamente sensible y capaz de identificar compuestos de forma precisa. Trabaja ionizando las moléculas y analizando e identificando los iones según su relación masa/carga (m/z). En análisis cuantitativos, el espectrómetro de masas se ajusta para monitorear sólo valores específicos de m/z representativos del analito. Esto se conoce como monitoreo selectivo de iones (SIM) (Plasencia, G., 2003). Los dos principales componentes en este proceso son la fuente de iones y el analizador de masa (Crawford Scientific, 2007).

Para lograr el acoplamiento entre HPLC y el espectrómetro de masas se crearon varias interfaces de ionización a presión atmosférica (API) con las cuales se vencieron algunos problemas debidos al funcionamiento intrínseco de cada equipo. Dichas consideraciones se muestran en la tabla 8 (Rodríguez, J.). Las técnicas de API más comunes son: electrospray (ESI), ionización química (APCI) y fotoionización (APPI).

Tabla 8. Consideraciones para el acoplamiento HPLC-MS

HPLC	MS
Separación en fase líquida a alta presión	Necesita de alto vacío
Produce una alta carga de vapor	Tolera una carga de gas limitada
Temperatura próxima a la ambiente	Opera a temperatura elevada

El electrospray es uno de los métodos de ionización desarrollados más recientemente. Es un método de ionización suave en el cual, una solución acuosa ácida o básica que contenga al analito es rociada desde la punta de un capilar al que se le aplica una diferencia de potencial de 3 – 4 kV. Con esto se logra una nebulización de la solución formando gotas de menos de 10 μm . Dichas gotas se encuentran altamente cargadas y van reduciendo su tamaño debido a que se les aplica calor y un gas de secado que

evaporan el disolvente. Cuando el tamaño de la gota es tal que las fuerzas de repulsión de las cargas supera la tensión superficial, la gota sufre explosiones Coulombicas y produce gotas más pequeñas hasta llegar a una sola molécula cargada (Crawford Scientific, 2007). Este proceso se esquematiza en la figura 11.

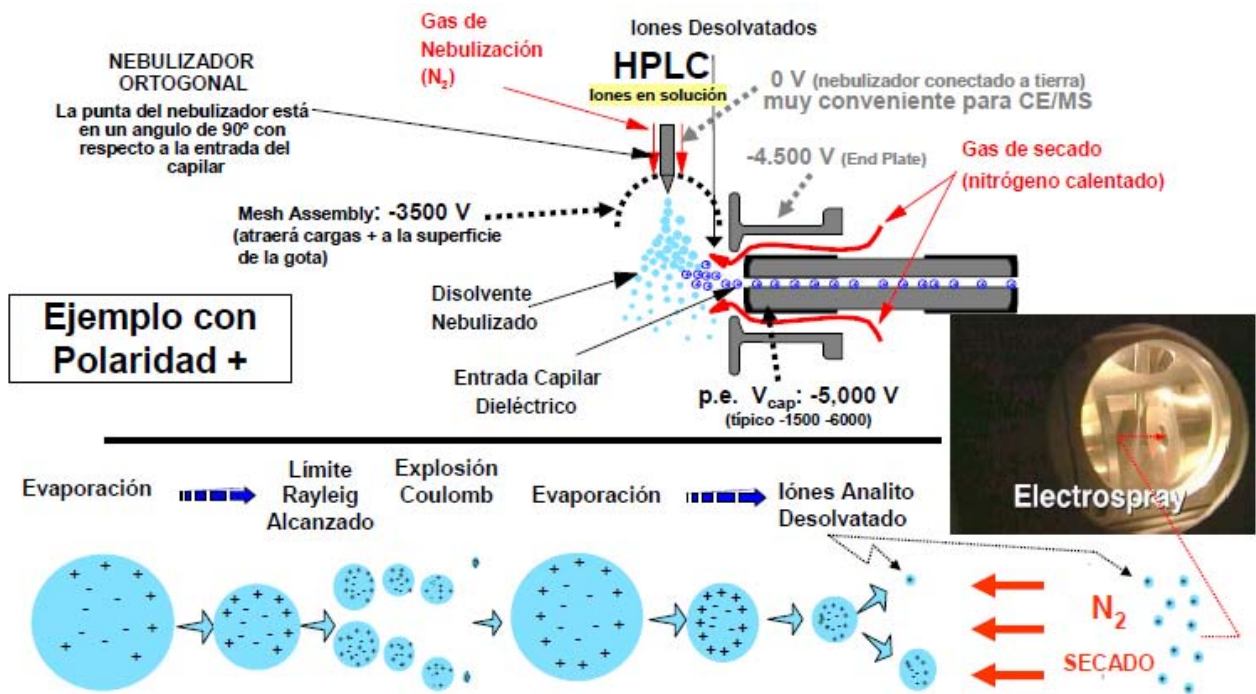


Figura 11. Proceso de ionización por electrospray.

Una vez generados los iones, estos entran al analizador de masas, el cual separa los iones producidos de acuerdo a su relación m/z empleando campos eléctricos y magnéticos. Actualmente están disponibles una gran variedad de analizadores de masas, incluyendo cuadrupolo (Q), trampa de iones, tiempo de vuelo (TOF), sector magnético, ciclotrón, entre otros (Plasencia, G., 2003). Los dos más usados en cromatografía de líquidos son cuadrupolo y trampa de iones, e incluso pueden usarse juntos.

El analizador de masas de cuadrupolo está compuesto por cuatro barras organizadas paralelamente como se observa en la figura 12. A cada par de barras se le aplica una combinación de voltajes de radiofrecuencia y corriente directa, produciendo campos hiperbólicos. Para cada par de voltajes, solo los iones de un valor de m/z específico son capaces de atravesar el cuadrupolo, los demás chocan en las superficies del mismo (Plasencia, G., 2003).

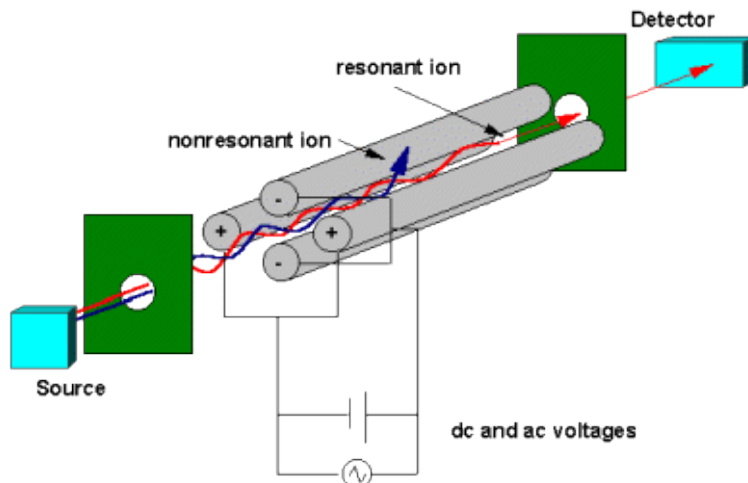


Figura 12. Analizador de cuadrupolo

De manera similar, el analizador de masas por trampa de iones usa campos eléctricos oscilantes para atrapar los iones en forma controlada dentro de un pequeño volumen entre tres electrodos. La variedad de potenciales que pueden aplicarse permiten atrapar iones por encima de un valor de m/z , atrapar iones de un valor específico de m/z o expulsar iones de relación m/z específica (Plasencia, G., 2003). Además, mediante disociación inducida por colisión (CID), generalmente con helio, se puede fragmentar la molécula, acumularse y después expulsarse hacia el detector, con lo cual se logra una mayor sensibilidad (Rodríguez, J.). La manera en que esto ocurre se esquematiza en la figura 13.

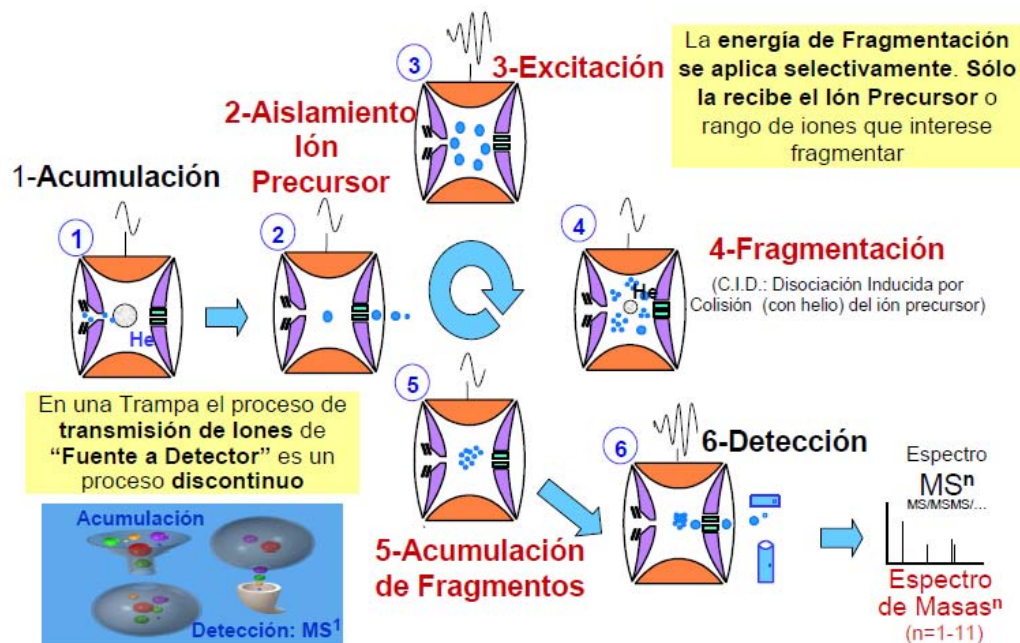


Figura 13. Analizador de trampa de iones.

Acoplar dos etapas de análisis de masas (MS/MS) resulta muy útil para la identificación de compuestos en mezclas complejas así como para la determinación de sustancias no conocidas. Actualmente existen equipos que hacen esto empleando un triple cuadrupolo. En estos sistemas, en el primer cuadrupolo se selecciona un ion de determinada relación m/z. Posteriormente, en el segundo cuadrupolo se lleva a cabo una colisión de los iones, los cuales pasan a un tercer cuadrupolo donde ocurre una segunda selección para que finalmente los iones deseados lleguen al detector.

En adición, existe una tecnología llamada Q TRAP que se basa en el uso de un triple cuadrupolo donde el último de estos puede ser usado como cuadrupolo o como trampa de iones. El resultado es un espectrómetro de masas en tándem de alta sensibilidad capaz de trabajar en todos los modos operacionales que tiene el triple cuadrupolo (Hager, J. W., 2003).

2.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Una vez que se tiene desarrollada una metodología para cuantificar el compuesto de interés en la matriz biológica deseada, ésta debe ser validada. La validación es el proceso de obtención de evidencia documentada de que el método desarrollado cumple con los criterios establecidos y por tanto sirve para el objeto para el que fue diseñado. Los parámetros fundamentales que se deben evaluar son: exactitud, precisión, selectividad, reproducibilidad y estabilidad.

Existen diversas guías que ayudan para el desarrollo de la validación de los métodos analíticos. En México se emplea la Norma Oficial Mexicana NOM 177-SSA1-2013, la cual en su apartado 9 habla sobre validación de métodos analíticos. Por otro lado, en Estados Unidos, la agencia regulatoria FDA expidió una guía para la validación de métodos bioanalíticos. Ambas indican los parámetros a evaluar y criterios que se deben cumplir en métodos analíticos para cuantificar fármacos en matrices biológicas. También incluyen algunas consideraciones generales como que todas las curvas de calibración y puntos control (PC) de fármaco deben prepararse en la misma matriz en la que se cuantificarán las muestras reales y que el contenido de disolvente usado en ellas no debe ser mayor al 5 % del volumen total preparado.

A continuación se presenta una tabla comparativa del contenido de ambos documentos.

Tabla 9. Comparación de los requisitos de validación de la NOM 177 y la guía de la FDA

PARÁMETRO	NOM 177-SSA1-2013	Guía FDA 2013
Selectividad Comprobar que los componentes endógenos no interfieran en la detección	Se deben analizar muestras blanco de al menos 6 fuentes diferentes. Probar matriz hemolizada y lipémica La respuesta analítica obtenida no debe ser mayor al 20 % de la respuesta del LC y del 5 % para el EI	Comprobar la no interferencia.
Efecto de matriz para métodos por espectrometría de masas	Extraer 6 muestras blanco y 6 muestras de matriz hemolizada y lipémica. Reconstituir con PCB y PCA en solución. Comparar respuestas analíticas obtenidas con las de la solución. Calcular el Factor de Matriz Normalizado (FMN). El %CV del FMN debe ser menor a 15 %	Se debe asegurar que no existe efecto de matriz, particularmente cuando se usa una matriz diferente a la de las muestra reales durante la validación.
Efecto de acarreo para métodos por espectrometría de masas	3 inyecciones de la misma muestra blanco, una antes y dos después de una inyección del límite superior de cuantificación. La señal analítica de los blancos debe ser menor al 20 % del LC y menor al 5 % para el EI	Asegurar que no aparezca señal del analito en muestras blanco inyectadas después de una muestra.
Límite de cuantificación (LC)	Debe determinarse de acuerdo al 5 % del Cmax reportado	Debe ser al menos 5 veces la respuesta del blanco. Realizar 5 inyecciones. El %CV y la exactitud no deben ser mayores a 20%
Curva de calibración	Compuesta por una muestra blanco, una muestra cero y al menos 6 concentraciones. Elegir el modelo matemático más sencillo que describa la respuesta. La concentración calculada de cada punto de la curva debe estar dentro del 15 % de la concentración nominal, excepto el LC que puede estar entre 20 %. Al menos el 75 % de los puntos de la curva deben cumplir el criterio incluyendo el LC. Los puntos que no cumplan deben excluirse y el modelo matemático no debe cambiar.	
	Analizar al menos 3 curvas. Del total de curvas evaluadas, al menos el 50 % de cada punto debe cumplir el criterio.	Analizar 6 curvas en varios días por duplicado cada día.

Continuación.

PARÁMETRO	NOM 177-SSA1-2013	Guía FDA 2013
Recobro		Comparar la respuesta analítica de muestras adicionadas extraídas con la de muestras no extraídas. No debe ser 100 % pero debe ser reproducible.
Repetibilidad	Analizar en un mismo día, al menos por quintuplicado, PCB, PCM, PCA y LC. Calcular la concentración obtenida.	Analizar en una misma corrida, al menos por quintuplicado, tres concentraciones dentro del rango de trabajo.
	El %CV de cada punto no debe ser mayor a 15 %, excepto para el LC donde no debe ser mayor a 20 %.	
Precisión intermedia	Analizar al menos por quintuplicado, en tres corridas analíticas diferentes, en al menos dos días los PCB, PCM, PCA y LC. Calcular la concentración obtenida.	Analizar en diferentes corridas, al menos por quintuplicado, tres concentraciones dentro del rango de trabajo. Puede cambiarse de analista, equipo, laboratorio y/o reactivos.
	El %CV de cada punto no debe ser mayor a 15 %, excepto para el LC donde no debe ser mayor a 20 %.	
Exactitud	Usar los datos de repetibilidad y reproducibilidad.	Analizar al menos por quintuplicado, tres concentraciones dentro del rango de trabajo.
	Calcular la desviación de la concentración obtenida respecto al valor nominal. El valor promedio del % desviación no debe ser mayor que el 15 %, excepto para el LC donde no debe ser mayor al 20 %.	
Estabilidad Probar la condiciones de temperatura, tiempos, etc. en las que se mantendrán las muestras durante el estudio	Analizar, al menos por triplicado, el PCB y PCA inmediatamente después de su preparación y después de ser sometidas a las condiciones de estabilidad. Se interpolaran sus respuestas en curvas recién preparadas. La concentración obtenida debe estar dentro del 15 % de la concentración nominal. Para la estabilidad en solución, la desviación no debe ser mayor al 10 %. Se debe evaluar estabilidad a corto y largo plazo, de la muestra procesada y en automuestreador, así como ciclos de congelación-descongelación.	

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la farmacocinética del compuesto {5-[(4-nitroencil)carbamoil]-1H-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (MEDS), en ratas.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

* Desarrollar un método analítico para cuantificar el compuesto MEDS en plasma de rata mediante cromatografía de líquidos acoplado a detector tándem de espectrometría de masas (LC-MS/MS)

* Validar el método desarrollado tomando como guía algunos de los parámetros señalados en la guía de la FDA para validación de métodos bioanalíticos 2013 y la NOM 177-SSA-2013.

* Evaluar la farmacocinética tras la administración de una dosis única de la molécula en ratas.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 MATERIALES, REACTIVOS y EQUIPOS

4.1.1 Preparación de soluciones

Materiales

- Matraces volumétricos de 10, 100 y 250 mL
- Tubos de ensayo de vidrio
- Gradillas para tubos de ensayo
- Pipetas automáticas Science MED de varios volúmenes
- Pipetas Pasteur de vidrio
- Probeta de 50 mL
- Puntas para pipeta automática Axygen Scientific
- Parafilm
- Microespátulas metálicas
- Naves para pesar de vidrio

Reactivos

- Agua grado HPLC
- Metanol grado HPLC (J.T. Baker)
- Acetonitrilo grado HPLC (J.T. Baker)
- Ácido fórmico 98 % de pureza (Fluka)
- Ácido trifluoroacético 99 % pureza (Sigma-Aldrich)
- SOALB 99% pureza (Chemco)
- MEDS sintetizado en el laboratorio 122 de la Facultad de Química de la UNAM con asesoría del Dr. Francisco Hernández Luis y la M. en C. Silvia Melchor

Equipos

- Sonicador Branson PC620
- Campana de extracción
- Vórtex Thermolyne 37600
- Balanza analítica Sartorius CP225D

4.1.2 Desarrollo y validación del método analítico

Materiales

- Jeringa Gastight #1001 (500 μ L) Hamilton para infusión al detector de masas
- Microviales de vidrio
- Equipo de filtración Millipore
- Frascos de vidrio Pyrex con tapón de rosca.
- Matraces kitasato de 1 L
- Frascos de vidrio Pyrex actinométrico con tapón de rosca.
- Crioviales de 3 y 4.5 mL
- Tubos de ensayo de vidrio con tapón de rosca
- Membrana durapore 0.45 μ m HV (Millipore)
- Repipeteador Eppendorf Plus
- Columna Gemini C18, 5 μ m, 150 x 4.6 mm
- Precolumna Phenomenex C18

Reactivos

- Metil terbutil éter R. A. (J.T. Baker)
- Éter isopropílico R. A. (J. T. Baker)
- Éter etílico R. A. (J. T. Baker)
- Diclorometano R.A. (Fisher Scientific)
- Cloroformo R.A. (Meyer)

Equipos

- Cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 series acoplado a un detector de masas ABSciex 3200 Q Trap
- Balanza granataria OHAUS Galaxy 4000 D
- Multi Pulse Vortexer Glas-Col
- Ultracongelador REVCO ULT-1786-3A 39
- Centrífuga BECKMAN modelo TJ-6
- Evaporador de muestras con nitrógeno
- Refrigerador Mabe CE120
- Parrilla de calentamiento Thermolyne 1000

4.1.3 Estudio de farmacocinética

Materiales

- Cánulas: Tubo de polietileno INTRAMEDIC PE10 (D.I. 0.28 mm, D.E. 0.61 mm)
- Tubo de polietileno INTRAMEDIC PE50 (D.I. 0.58 mm, D.E. 0.965 mm) CLAY ADAMS Becton Dickinson
- Suturas: Proleno 8-0 y 3-0
- Hojas de bisturí #15
- Pegamento Kola Loka líquido
- Alfileres con cabeza de plástico
- Lima metálica
- Jeringas de 1, 3, 5 y 10 mL
- Tubos de plástico de 0.5 y 1.5 mL
- Jaulas de policarbonato con reja metálica
- Calentador de aire
- Lámpara
- Cinta Micropore
- Cánulas curvas para administración oral para rata

Reactivos

- Xilocaina Spray (Rimsa)
- Heparina solución inyectable 5000 UI/mL
- Pentobarbital sódico. Solución inyectable.

Equipos

- Homogeneizador Polytron modelo MR 2100

Animales de experimentación

- Ratas Wistar macho de 300-350 g

4.2 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Todos los volúmenes empleados fueron tomados con pipetas automáticas calibradas.

Plasma de rata

El plasma de rata empleado para preparar las soluciones usadas en la validación y la cuantificación de muestras fue obtenido de ratas Wistar sanas provistas por el bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía.

4.2.1 Soluciones generales

Ácido trifluoroacético 2 % en metanol

En un matraz volumétrico de 100 mL se colocó metanol y se adicionaron 2 mL de ácido trifluoroacético (ATF) concentrado. Se agitó y posteriormente se aforó con metanol.

Ácido trifluoroacético 0.02 %

En un matraz volumétrico de 250 mL se colocó agua grado HPLC y se adicionaron 50 μ L de ATF concentrado. Se llevó al aforo con agua grado HPLC.

Ácido fórmico 5 mM

En un matraz volumétrico de 250 mL se colocó agua grado HPLC y se adicionaron 47 μ L de ácido fórmico concentrado. Se llevó al aforo con agua grado HPLC.

Fase móvil

En una probeta de 50 mL se midieron 30 mL de ácido fórmico 5 mM y se vació a un recipiente limpio. Con la misma probeta se midieron 33 mL de ACN y se vació al mismo frasco. Por último se midieron 37 mL de MeOH y se añadieron a la mezcla. Se agitó y se guardó la mezcla en un frasco ámbar con tapa por máximo 1 semana.

Solución de adecuabilidad del sistema

La solución para comprobar la adecuabilidad del sistema se preparó como se muestra en el diagrama 1. Esta solución contenía MEDS y SOALB en concentración de 300 y 600 ng/mL, respectivamente.

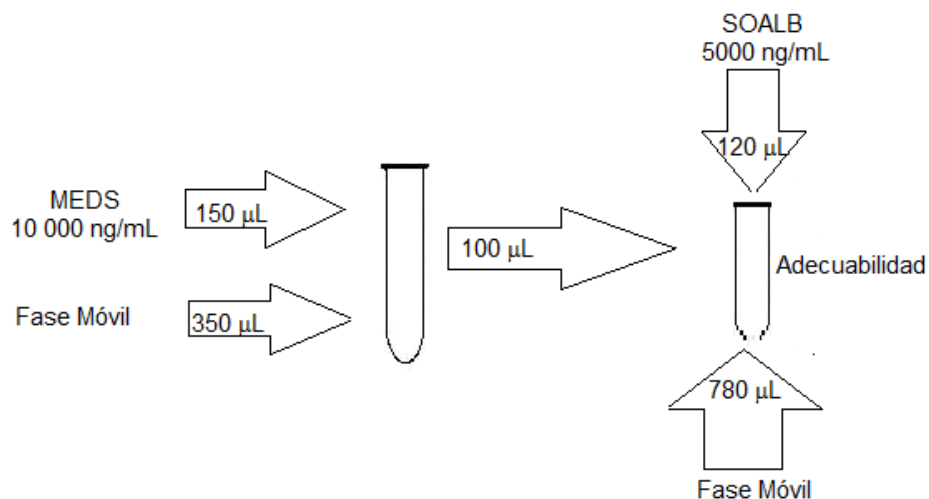


Diagrama 1. Preparación de la solución de adecuabilidad.

4.2.2 Soluciones stock

Solución stock de MEDS 0.1 mg/mL

Se pesó 1 mg de MEDS y se disolvió con ATF 2 % en MeOH. Se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL y se sonicó por 5 min. Posteriormente se llevó al aforo con la misma solución de ATF.

Solución stock de SOALB 0.1 mg/mL

Se pesó 1 mg de SOALB y se disolvió con ATF 2 % en MeOH. Se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL y se sonicó por 5 min. Posteriormente se llevó al aforo con la misma solución de ATF.

4.2.3 Soluciones estándar

4.2.3.1 Soluciones estándar de MEDS

Solución A. MEDS 10 000 ng/mL

Se tomó 1 mL de la solución stock de MEDS y se llevó a un matraz volumétrico de 10 mL. Se aforó con fase móvil.

Solución B. MEDS 1 000 ng/mL

Se tomó 1 mL de la solución B y se llevó a un matraz volumétrico de 10 mL. Se aforó con fase móvil.

4.2.3.2 Soluciones estándar de SOALB

Solución C. SOALB 50 000 ng/mL

Se tomaron 5 mL de la solución stock de SOALB y se llevaron a un matraz volumétrico de 10 mL. Se aforó con fase móvil.

Solución D. SOALB 5 000 ng/mL

Se tomaron 1 mL de la solución C y se llevó a un matraz volumétrico de 10 mL. Se aforó con fase móvil.

Solución E. SOALB 300 ng/mL

Se tomaron 600 μ L de la solución D y se llevó a un matraz volumétrico de 10 mL. Se aforó con fase móvil.

4.2.4 Curva de calibración

Curva de calibración en plasma

La curva de calibración en plasma se preparó conforme a las tablas 10 y 11.

Tabla 10. Preparación de las soluciones parciales

ID	Solución de MEDS empleada	Alícuota (μ L)	Alícuota de FM (μ L)	[Parcial] ng/mL
C1 P	Solución B	30	970	30
C2 P	Solución B	100	900	100
C3 P	Solución B	200	800	200
C4 P	Solución A	40	960	400
C5 P	Solución A	80	920	800
C6 P	Solución A	120	880	1 200
C7 P	Solución A	160	840	1 600
C8 P	Solución A	200	800	2 000

Tabla 11. Preparación de las soluciones finales

ID	[MEDS] ng/mL empleada	Alícuota (μL)	Plasma (μL)	[MEDS] final ng/mL
C1	30	50	950	1.5
C2	100	50	950	5
C3	200	50	950	10
C4	400	50	950	20
C5	800	50	950	40
C6	1 200	50	950	60
C7	1 600	50	950	80
C8	2 000	50	950	100

Curva de calibración en solución

La curva de calibración en solución se preparó conforme a las tablas 12 y 13.

Tabla 12. Preparación de las soluciones parciales

ID	Solución de MEDS empleada	Alícuota (μL)	Alícuota de FM (μL)	[Parcial] ng/mL
C1 P	Solución B	90	910	90
C2 P	Solución B	300	700	300
C3 P	Solución B	600	400	600
C4 P	Solución A	120	880	1 200
C5 P	Solución A	240	760	2 400
C6 P	Solución A	360	640	3 600
C7 P	Solución A	480	520	4 800
C8 P	Solución A	600	400	6 000

Tabla 13. Preparación de las soluciones finales

ID	[MEDS] ng/mL empleada	Alícuota (μ L)	SOALB (μ L) 5 000 ng/mL	Fase móvil (μ L)	[MEDS] final ng/mL
C1	90	100	120	780	9
C2	300	100	120	780	30
C3	600	100	120	780	60
C4	1 200	100	120	780	120
C5	2 400	100	120	780	240
C6	3 600	100	120	780	360
C7	4 800	100	120	780	480
C8	6 000	100	120	780	600

4.2.5 Puntos control

Selección y preparación de los puntos control en plasma

Los puntos control seleccionados fueron: Punto control alto (PCA): 90 ng/mL, Punto control medio (PCM) 50 ng/mL y Punto Control Bajo (PCB): 4 ng/ml.

Los puntos control en plasma se prepararon conforme a las tablas 14 y 15.

Tabla 14. Preparación de las soluciones parciales para los puntos control

ID	Solución de MEDS empleada	Alícuota (μ L)	Alícuota de FM (μ L)	[Parcial] ng/mL
PCB P	Solución B	80	920	80
PCM P	Solución A	100	900	1 000
PCA P	Solución A	180	820	1 800

Tabla 15. Preparación de las soluciones finales. Puntos control

ID	[MEDS] ng/mL empleada	Alícuota (μ L)	Plasma (μ L)	[MEDS] final ng/mL
PCB	80	100	1 900	4
PCM	1 000	100	1 900	50
PCA	1 800	100	1 900	90

Puntos control en solución

Los puntos control en solución empleados para evaluar el recobro se prepararon conforme a las tablas 16 y 17.

Tabla 16. Puntos Control. Preparación de las soluciones parciales

ID	Solución de MEDS empleada	Alícuota (μL)	Alícuota de FM (μL)	[Parcial] ng/mL
PCB P	Solución B	120	380	240
PCM p	Solución A	150	350	3 000
PCA P	Solución A	270	230	5 400

Tabla 17. Puntos Control. Preparación de las soluciones finales

ID	[MEDS] ng/mL empleada	Alícuota (μL)	SOALB (μL) 5 000 ng/mL	Fase móvil (μL)	[MEDS] final ng/mL
PCB	240	100	120	780	24
PCM	3 000	100	120	780	300
PCA	5 400	100	120	780	540

4.3 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

El método elegido para la cuantificación del compuesto MEDS en plasma de rata fue LC-MS/MS, debido a que se esperaban concentraciones bajas en el estudio farmacocinético. Es por esto que el primer paso fue la selección de las condiciones del detector para lograr la mejor respuesta.

4.3.1 Detección en el espectrómetro de masas

Se infundió metanol directamente al detector a un flujo de 0.1 mL/min. Se optimizaron las condiciones para obtener una línea base alta y estable modificando manualmente los parámetros de flujo de nitrógeno, temperatura y voltaje.

MEDS

Se infundió una solución de MEDS 100 ng/mL en TFA 2 % en metanol al detector. Se empleó el método de tuning automático con el fin de optimizar las condiciones de ionización del analito. Se llevó a cabo la ionización del compuesto y se obtuvo el ion

fragmento más abundante. Se evaluaron los diferentes potenciales y la energía de colisión para la transición encontrada.

SOALB, venlafaxina, carbamazepina

Se infundieron directamente al detector soluciones de cada compuesto a una concentración de 100 ng/mL en metanol. Empleando el método de tuning automático, se llevó a cabo la ionización del compuesto y se obtuvo el ion fragmento más abundante. Se optimizaron los diferentes potenciales y la energía de colisión para la transición encontrada de manera que la señal del ion fragmento fuera del doble de la señal obtenida por el ión precursor.

Condiciones del detector para la fase móvil

La fase móvil a emplear se infundió con flujo de 0.8 mL/min y se adecuaron los parámetros de flujo de nitrógeno, temperatura y voltaje para obtener una señal alta y estable de la línea base. Las condiciones seleccionadas para los análisis fueron:

*Gas Cortina (CUR): 10 psi

*Voltaje del capilar para formación del spray: 5500 V

*Temperatura: 600 °C

*Gas 1: 40 psi

*Gas 2: 40 psi

4.3.2 Selección de la fase móvil y el estándar interno (EI)

Se probaron 2 fases móviles y 3 estándares internos. Las fases móviles fueron soluciones acuosas conteniendo TFA 0.02 % o bien ácido fórmico 5 mM: acetonitrilo: metanol en proporción 30:33:37.

Para determinar la mejor fase móvil se inyectaron en diferentes ocasiones, el punto control medio en solución y se evaluó la forma de los picos, el tiempo de retención y la señal del MEDS obtenida con cada una de ellas.

Los estándares internos (EI) probados fueron sulfóxido de albendazol (SOALB), venlafaxina (VEN) y carbamazepina (CBZ). Para su evaluación, se prepararon soluciones en fase móvil del PCM de MEDS en concentración 800, 7.5 y 162.5 ng/mL de cada uno respectivamente. Dichas soluciones se inyectaron por triplicado. Posteriormente se inyectaron 7 blancos de plasma reconstituidos con cada una de las soluciones. En cada

uno de los casos, se evaluó la forma del pico del EI, el efecto de matriz, el tiempo de retención y el %CV del factor de respuesta.

4.3.3 Selección del disolvente de extracción

Para realizar estas pruebas, se preparó el PCM de MEDS en plasma. Esta solución se extrajo por quintuplicado con el método mostrado en el diagrama 2, empleando 3 diferentes disolventes de extracción: metil ter-butil éter (MTBE), éter isopropílico y una mezcla de éter: diclorometano: cloroformo (60:30:10). Estos disolventes fueron elegidos con base en la solubilidad del compuesto y para evitar la extracción de componentes de la matriz.

Se evaluó el recobro de la extracción comparando la respuesta obtenida con la respuesta de un blanco reconstituido con el PCM en solución, así como su % CV.

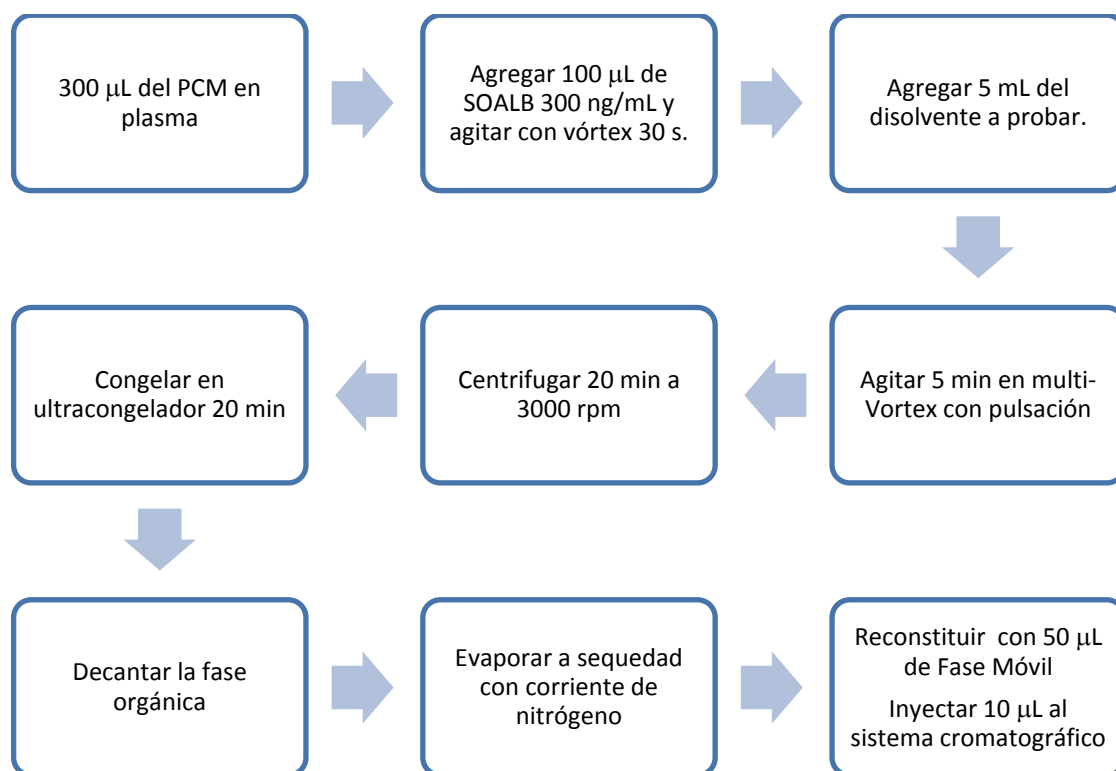


Diagrama 2. Procedimiento de extracción.

4.3.4 Optimización de la extracción

Una vez seleccionado el disolvente de extracción, se procedió a la optimización de las condiciones de extracción. Para ello, se realizó un diseño factorial de dos factores y dos niveles. Los factores a evaluar fueron la cantidad de disolvente de extracción y el tiempo de agitación. Los niveles probados se muestran en la tabla 18. La muestra a extraer fue el PCM preparado en plasma de rata. Se siguió el procedimiento del diagrama 2.

El experimento se llevó a cabo por duplicado y la respuesta monitoreada fue el recobro del MEDS y del SOALB.

Tabla 18. Factores a evaluar en el diseño factorial

Factor	Nivel bajo	Nivel alto
Volumen de MTBE	3 mL	5 mL
Tiempo de agitación	3 min	5 min

4.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Los parámetros que se consideraron para la validación fueron selectividad, acarreo, efecto de matriz, recobro, límite de cuantificación, linealidad, precisión, exactitud y estabilidad.

En las pruebas en las que se necesitaba comparar la respuesta con la respuesta del Límite de Cuantificación (LC), éste se inyectó por triplicado. En las pruebas de precisión, exactitud y estabilidad se inyectó una curva de calibración preparada el mismo día del análisis. Antes de analizar las muestras se evaluaba la adecuabilidad del sistema, inyectando 5 muestras de la solución de adecuabilidad. Si el CV era menor a 7, se procedía con el análisis de las muestras.

4.4.1 Selectividad (NOM 177-SSA1-2013)

Se analizaron 6 muestras blanco de plasma de 6 animales diferentes. Asimismo, se analizaron 6 muestras blanco de plasma hemolizado.

Criterio de aceptación: La respuesta analítica de los picos cercanos a los tiempos de retención no debe ser mayor al 20 % de la respuesta del LC y del 5 % para el EI.

4.4.2 Acarreo (NOM 177-SSA1-2013)

Se extrajeron 3 muestras blanco y una muestra del límite superior de cuantificación (LSC). Se inyectó al sistema cromatográfico un blanco, el LSC y dos blancos más.

Criterio de aceptación: La respuesta analítica de los picos cercanos a los tiempos de retención no debe ser mayor al 20 % de la respuesta del LC y del 5 % para el EI.

4.4.3 Efecto de matriz (NOM 177-SSA1-2013)

Se extrajeron 12 muestras blanco de plasma normal y 12 muestras blanco de plasma hemolizado. 6 muestras de cada tipo se reconstituyeron con el PCB en solución y los otros 6 con el PCA. Todas las muestras fueron inyectadas al sistema cromatográfico junto con soluciones de los PCB y PCA por quintuplicado. Se calculó el Factor de Matriz Normalizado (FMN) empleando la siguiente ecuación:

$$FMN = \frac{(\text{Área de la señal correspondiente al MEDS}/\text{área de la señal correspondiente al SOALB})\text{en la matriz}}{(\text{Área de la señal correspondiente al MEDS}/\text{área de la señal correspondiente al SOALB})\text{en solución}}$$

Se calculó el % CV del FMN que debe ser menor a 15 %.

4.4.4 Recobro (Guía FDA 2013)

Se analizó el PCB y PCA en plasma por quintuplicado. Se comparó la respuesta analítica obtenida con la de blancos reconstituidos con los PCB y PCA en solución. Se calculó el %CV.

4.4.5 Límite de cuantificación (NOM 177-SSA1-2013 y Guía FDA 2013)

Para asegurar la repetibilidad del LC, ésta concentración se extrajo y analizó por quintuplicado.

4.4.6 Linealidad (Guía FDA 2013)

El intervalo de concentraciones fue de 1.5 a 100 ng/mL de MEDS. Para evaluar la linealidad se preparó una curva de calibración en plasma, la cual se extrajo por triplicado. Esto se repitió en 2 días consecutivos. Para cada una de las curvas se graficó el factor de respuesta en función de la concentración de MEDS. Se eligió el modelo matemático al que mejor se ajustaron los datos. De cada una de las curvas se calculó la pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de correlación (r).

Con ayuda del software del equipo (MultiQuant), se calculó la concentración de cada punto así como la exactitud. La concentración calculada de cada punto de la curva debía estar

dentro del 15 % de la concentración nominal, excepto el LC que puede estar dentro del 20 %. Al menos el 75 % de los puntos de la curva debían cumplir el criterio incluyendo el LC.

4.4.7 Precisión (NOM 177-SSA1-2013)

La precisión se evaluó como repetibilidad y precisión intermedia.

4.4.7.1 Repetibilidad

Se analizaron por quintuplicado en un solo día el PCB, PCM, PCA y LC. Las concentraciones de los puntos control fueron 4 ng/mL (PCB), 50 ng/mL (PCM) y 90 ng/mL (PCA). Se inyectaron al sistema cromatográfico y se calculó su concentración. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el %CV de cada punto.

El %CV de cada punto no debía ser mayor a 15 %, excepto para el LC donde no debía ser mayor a 20 %.

4.4.7.2 Precisión intermedia

Se prepararon por quintuplicado durante dos días el PCB, PCM, PCA y LC. Se inyectaron al sistema cromatográfico y se calculó su concentración. Se determinó el promedio, la desviación estándar y el %CV de cada punto usando los datos de los dos días.

El %CV de cada punto no debía ser mayor a 15 %, excepto para el LC donde no debía ser mayor a 20 %.

4.4.8 Exactitud (NOM 177-SSA1-2013)

A partir de los datos de precisión intermedia se calculó el % de desviación con respecto a la concentración nominal de cada dato con la ecuación siguiente:

$$\% \text{ desviación} = \frac{C \text{ adicionada} - C \text{ obtenida}}{C \text{ adicionada}} * 100$$

El valor promedio del % de desviación no debía ser mayor al 15 %, excepto para el LC donde no debía ser mayor al 20 %.

4.4.9 Estabilidad (NOM 177-SSA1-2013)

Las condiciones de estabilidad que se evaluaron fueron: estabilidad de muestra procesada, estabilidad en automuestreador, estabilidad a largo plazo y estabilidad en solución. No se

evaluó estabilidad a corto plazo ni ciclos de congelación-descongelación dado que se había documentado previamente empleando un método por HPLC. Todas las muestras de estabilidad fueron evaluadas junto con una curva de calibración recién preparada en la cual se interpolaron las respuestas obtenidas. El criterio para considerar estables las muestras fue que la concentración obtenida de cada punto debía estar dentro del 15 % de la concentración nominal. Para la estabilidad en solución, la desviación no debe ser mayor al 10 %.

4.4.9.1 Estabilidad de la muestra procesada

En un día se prepararon y extrajeron el PCB y el PCA en plasma por triplicado. Una vez evaporadas las muestras, se guardaron en refrigeración por 24 h. Pasado ese tiempo se analizaron dichas muestras y se calculó la concentración y el % de desviación con respecto a la concentración nominal.

4.4.9.2 Estabilidad en automuestreador

Para esto se realizó la extracción del PCB y PCA por triplicado. Una vez reconstituidas las muestras, se inyectaron al sistema cromatográfico y se mantuvieron en el automuestreador a temperatura ambiente por 2.5 h. Pasado ese tiempo se volvieron a inyectar. Se calculó la concentración obtenida de cada punto y el % de desviación de la concentración nominal.

4.4.9.3 Estabilidad a largo plazo

Se prepararon por triplicado muestras del PCB y PCA y se almacenaron durante 15 días a -70 °C. Pasado ese tiempo se descongelaron, homogenizaron en vórtex y se extrajeron empleando el método desarrollado. Se analizaron en el cromatógrafo y se calculó la concentración obtenida de cada punto y el % de desviación de la concentración nominal.

4.4.9.4 Estabilidad de la solución stock de MEDS 0.1 mg/mL

Se evaluó la estabilidad de soluciones stock, las cuales se guardaron en refrigeración durante 3, 7 y 8 meses. A partir de esas soluciones se preparó la solución A (página 30). A continuación se preparó el PCM en solución como se indica en las tablas 16 y 17.

El día del análisis, se preparó una solución stock fresca de MEDS. A partir de ella se elaboró una curva de calibración en solución y una solución de PCM.

Se calculó la concentración obtenida y el % de desviación de la concentración nominal.

4.5 ESTUDIO DE FARMACOCINÉTICA

4.5.1 Formulación

Para el estudio de farmacocinética del compuesto MEDS, se empleó una formulación del mismo en carboximetilcelulosa (CMC) 0.5 %. Para su preparación se pesaron 62.58 mg de MEDS y se mezclaron con 3 mL de la solución de CMC. Se agitó en vórtex y posteriormente se mezcló con un homogeneizador. Justo antes de la administración se agitó la suspensión con vórtex.

4.5.2 Animales de experimentación

Se emplearon 20 ratas Wistar macho de 300-350 g. Los animales tuvieron libre acceso a agua y alimento antes del estudio, se mantuvieron en cuartos con temperatura controlada de 23 ± 2 °C y con ciclos de luz oscuridad de 12 h. Se mantuvieron antes y durante el estudio en jaulas de policarbonato.

4.5.3 Diseño del estudio

Los animales se mantuvieron en ayuno con agua *ad libitum* por 18 horas antes de la administración de la dispersión del MEDS. El día del estudio se les realizó una cirugía en la vena lateral de la cola para insertarles una cánula para la toma de muestras sanguíneas. Durante el procedimiento los animales fueron anestesiados con isoflurano. La dosis de inducción del anestésico fue de 3 % y la dosis de mantenimiento fue de 1.5 – 2 %.

Una vez que los animales se recuperaron por completo de la anestesia, se les administró la dispersión por vía oral con ayuda de una cánula a una dosis de 20.86 mg/kg, la cual es equimolar a la dosis empleada de albendazol.

Se tomaron muestras sanguíneas a los siguientes tiempos: 0, 30 min, 1.5, 3, 5, 6, 7, 9, 12, 24 y 30 horas. A cada animal se le tomaron 4 muestras de 700 µL de sangre a diferentes tiempos de muestreo por medio de la cánula. Las muestras de 24 y 30 horas fueron obtenidas por punción cardíaca, empleando 1 animal para cada muestra.

Las muestras se colectaron en tubos de plástico de 1.5 mL heparinizados. Una vez colectadas, se centrifugaron a 3000 rpm por 20 min. El plasma se separó con ayuda de pipetas pasteur de vidrio y se almacenó en congelación a -70 °C hasta el día del análisis.

Al momento de analizar las muestras, éstas se descongelaron a temperatura ambiente y se homogeneizaron con vórtex. Las muestras se analizaron empleando el método

previamente validado y las respuestas se interpolaron en una curva para obtener la concentración de MEDS.

4.5.4 Parámetros farmacocinéticos

Los datos de concentración plasmática se modelaron empleando el programa Phoenix WinNonLin 6.4, empleando un modelo no compartimental. Se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos: concentración plasmática máxima (C_{max}), tiempo en el que se alcanza la concentración máxima (t_{max}), área bajo la curva (AUC), vida media de eliminación ($t_{1/2}$) y tiempo medio de residencia (TMR).

4.6 Análisis estadístico

Todas las pruebas estadísticas se realizaron empleando el programa Statgraphics Centurion XVII empleando un nivel de significancia de 0.05.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO POR LC/MS/MS

5.1.1 Detección en el espectrómetro de masas

Dado que el método de cuantificación elegido fue cromatografía de líquidos acoplado a un detector de tándem masas/masas, el primer paso consistió en encontrar las condiciones óptimas del detector para lograr la detección de la molécula y el estándar interno empleado.

En la figura 14 se muestra el espectro de masas obtenido del MEDS al infundir una solución del mismo. Asimismo, se muestra la fragmentación propuesta del compuesto. De igual manera, en la figura 15 se muestran para el SOALB.

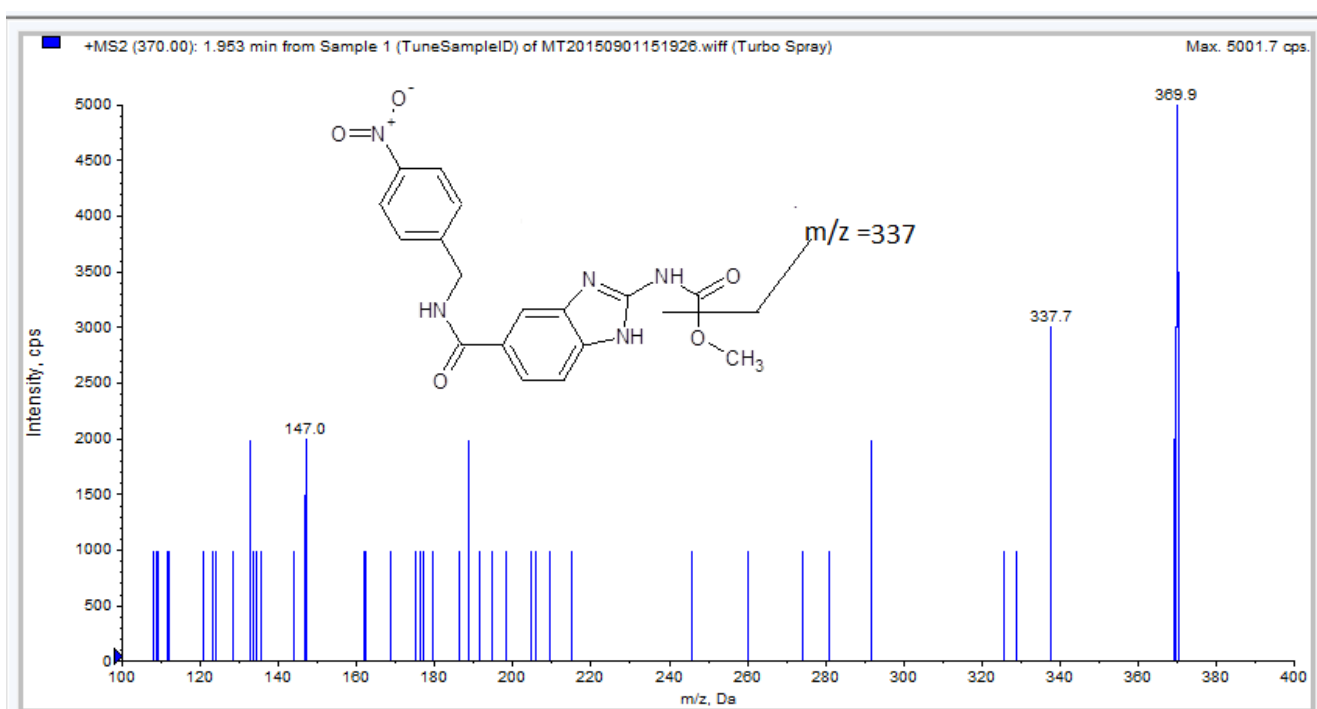


Figura 14. Espectro de masas del MEDS

Una vez que se conoció la fragmentación de ambas moléculas, se optimizaron las condiciones para obtener una señal del ion fragmento con una intensidad de aproximadamente el doble de la obtenida del ion precursor. De esta manera se asegura que el ion fragmento monitorizado proviene del precursor correcto. Dichas condiciones se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Condiciones para la fragmentación usadas en el modo MRM.

Compuesto	Transición	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)	Tiempo (ms)
MEDS	370 > 337 m/z	45	10.5	30.8	4.4	300
SOALB	282 > 240 m/z	44	10	12	5.4	300

El mismo proceso se siguió para obtener las condiciones de ionización de los otros estándares probados.

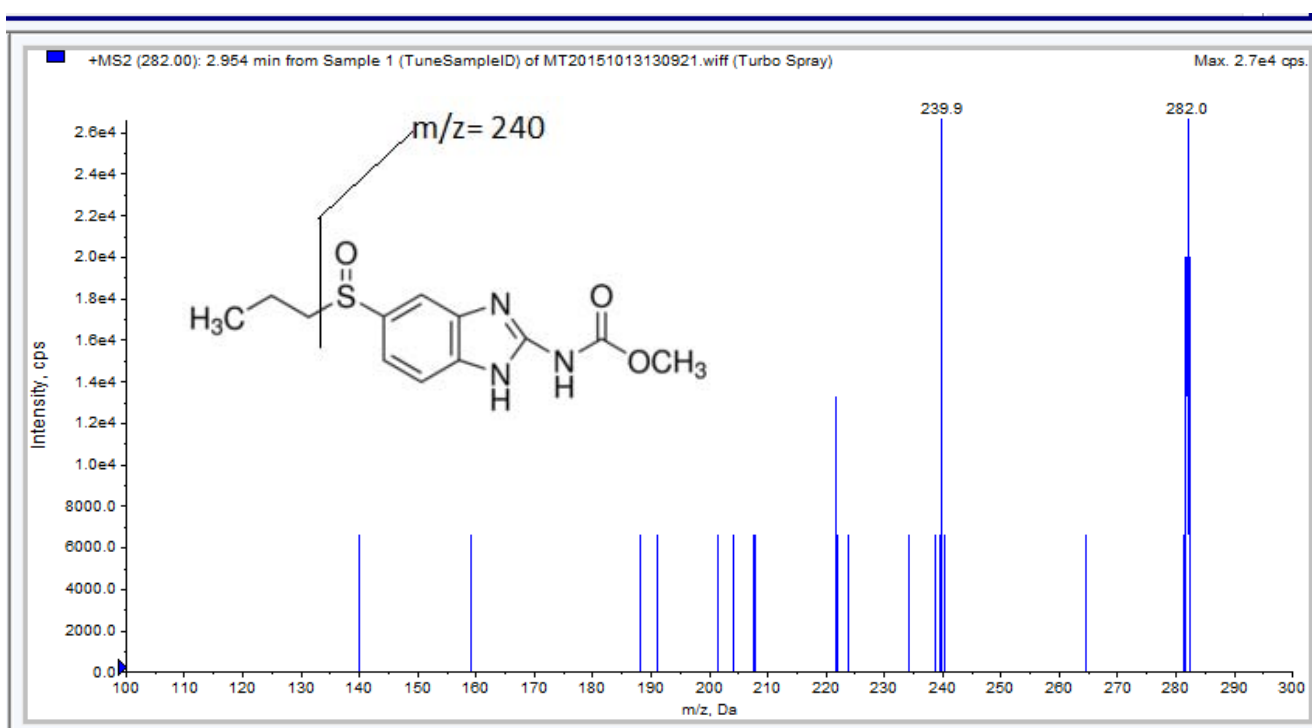


Figura 15. Espectro de masas del SOALB

5.1.2 Elección de la fase móvil y el EI

Anteriormente ya se contaba en el laboratorio con una metodología por LC-MS para la cuantificación del compuesto MEDS. Es por ello que se decidió emplear la misma fase móvil, que consistía en una mezcla TFA 0.02%: acetonitrilo: metanol (30:33:37).

El TFA se emplea para mejorar la retención ya que es un reactivo formador de par iónico, además de que reduce las interacciones con los silanoles libres, por lo que mejora la forma de los picos. Sin embargo, presenta una alta tensión superficial, lo cual impide la formación

del spray de forma eficiente. Además, los iones de TFA en la fase gas pueden unirse a los grupos básicos de las moléculas, suprimiendo así la ionización (Sigma Aldrich, 2012).

Fue por este motivo que se evaluó una segunda fase móvil que contenía las mismas proporciones de disolventes pero empleando ácido fórmico 5 mM en vez del TFA. Con esta nueva fase móvil se obtuvo una respuesta analítica del MEDS 950 veces mayor que la obtenida con el TFA, lo cual comprueba el efecto de dicho aditivo sobre la ionización de la molécula. Por este motivo se eligió esta fase móvil para la cuantificación de las muestras.

Tabla 20. Tiempos de retención logrados con cada fase móvil

Compuesto	Tiempo de retención (min)	
	ATF	Ácido fórmico
MEDS	2.23	2.73
SOALB	2.21	2.48

En cuanto a la selección del EI, en la figura 16 se muestran los cromatogramas obtenidos con los estándares evaluados. En ella se observa que los tres fármacos generan picos simétricos y adecuados, pero el que presenta el tiempo de retención más cercano al MEDS fue el SOALB. Esta característica lo hace deseable como EI porque indica que tiene propiedades cromatográficas similares a las del MEDS y por tanto tiene más probabilidades de corregir errores debidos a la co-elución de compuestos de la matriz con el MEDS.

Posteriormente se evaluó el efecto de matriz para cada fármaco, obteniendo los resultados mostrados en la tabla 21. En ella se puede observar que la venlafaxina presenta efecto de matriz, probablemente porque en su tiempo de retención eluyen componentes del plasma y dan lugar a supresión iónica.

Tabla 21. Efecto de matriz observado en los fármacos probados como EI

	VEN	SOALB	CBZ
% respuesta respecto a la solución	41.58	83.03	89.47
DE	3.49	4.28	7.40
CV	8.40	5.15	8.27

n = 7

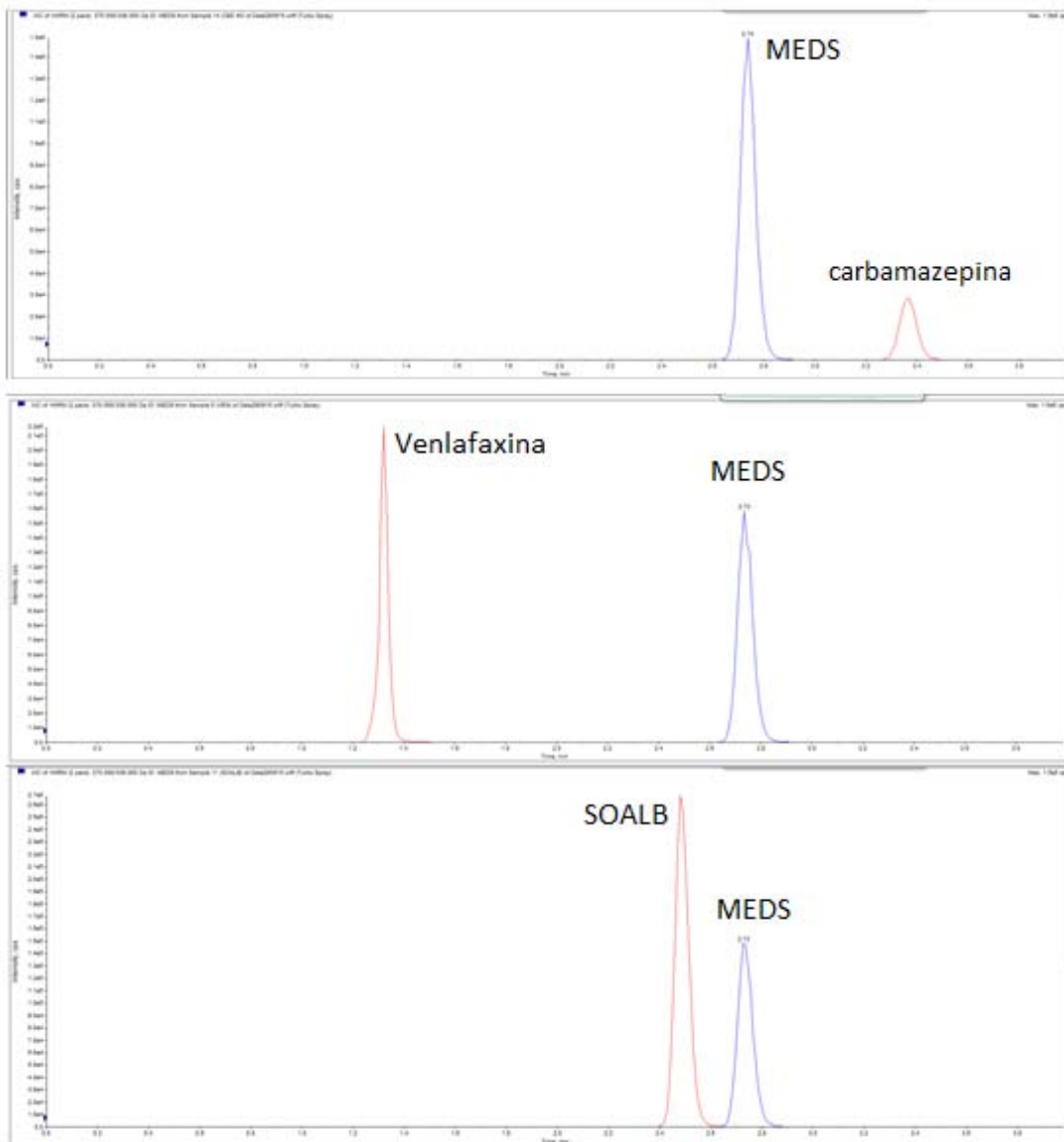


Figura 16. Cromatogramas del PCM en solución con cada EI evaluado.

Por último, se calculó el %CV del factor de respuesta obtenido con cada molécula de prueba. Se obtuvieron valores de 13.84 %, 3.06 % y 9.45 % para VEN, SOALB y CBZ respectivamente. Es por lo anterior que se eligió el SOALB como estándar interno.

La concentración del EI se seleccionó tomando como base aquella con la cual se obtuviera una señal con área similar a la obtenida por la señal del MEDS en el PCM en plasma. Por ende se deben agregar 100 μ L de una solución de SOALB 300 ng/mL.

5.1.3 Selección del disolvente de extracción

Se probaron 3 diferentes disolventes de extracción apolares, los cuales fueron elegidos con base en la solubilidad del MEDS y como estrategia para evitar el efecto de matriz. Para esto último se tomó en cuenta que el efecto de matriz se incrementa al aumentar la polaridad de los disolventes empleados en la extracción. En adición, utilizando mezclas de disolventes se puede evitar la extracción de los fosfolípidos que generan dicho efecto no deseado. Sin embargo, existen dos disolventes que han demostrado remover los fosfolípidos en gran medida al emplearse solos: el MTBE y el 1-clorobutano. Un ejemplo de esto se muestra en la figura 17 (Jemal, M., 2009; Chambers, E., 2007 y Gosh, C., 2012).

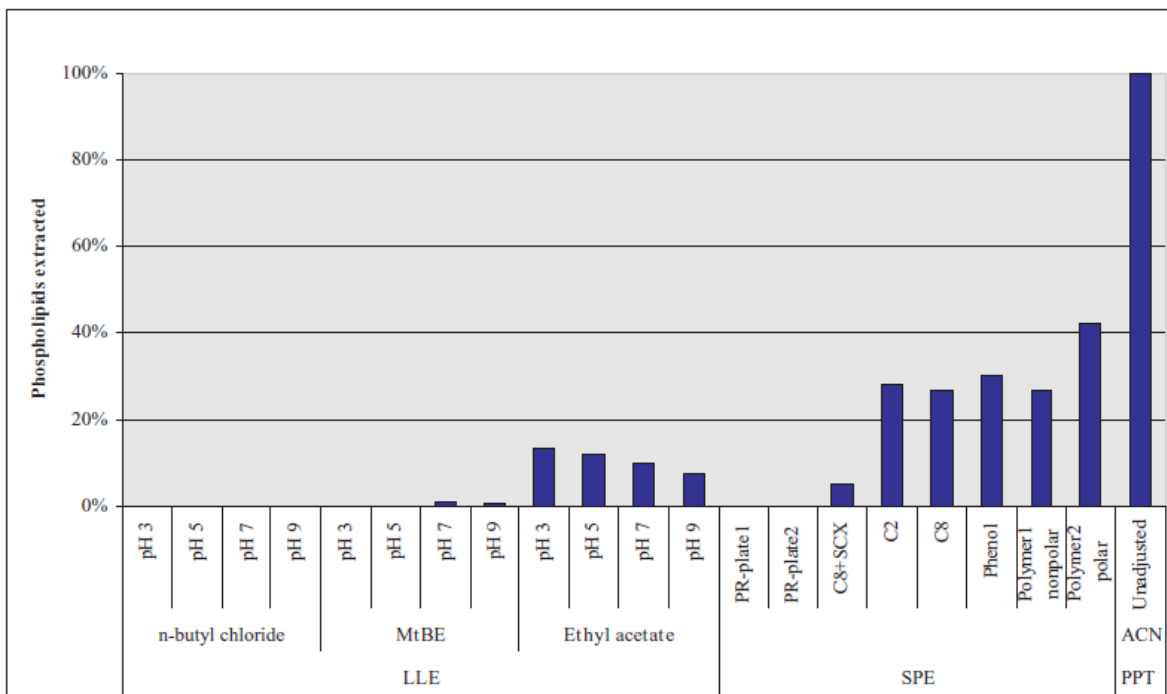


Figura 17. Porcentaje de fosfolípidos extraídos empleando diferentes técnicas a partir de muestras de plasma humano

Fue por lo anteriormente explicado que se probaron los siguientes disolventes: metil terbutil éter, éter isopropílico y una mezcla de éter: diclorometano: cloroformo (60:30:10 v/v/v). Se evaluó el recobro de MEDS por quintuplicado con cada uno y se realizó una prueba de ANOVA para comparar los resultados, además de una prueba de Tukey para conocer si existía diferencia en el recobro entre los disolventes, obteniendo lo mostrado en las tablas 22 y 23.

Tabla 22. ANOVA para recobro por disolvente

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1773.47	2	886.734	22.97	0.0001
Intra grupos	463.237	12	38.6031		
Total (Corr.)	2236.71	14			

Tabla 23. Prueba de Tukey

Disolvente	Casos	Media	Grupos Homogéneos
Éter isopropílico	5	60.89	X
Mezcla	5	78.82	X
MTBE	5	86.82	X

En las tablas se observa que el recobro empleando MTBE y la mezcla de disolventes son iguales estadísticamente. Sin embargo, se eligió el primero para la extracción dadas las referencias que se tenían de que ocasiona poco efecto de matriz y por la facilidad de su uso.

5.1.4 Optimización de la extracción

Para optimizar la cantidad de disolvente y el tiempo de agitación en la extracción se realizó un diseño de experimentos de 2 x 2. El diseño fue analizado con el programa Statgraphics y se obtuvieron los resultados mostrados a continuación. La figura 18 se refiere al recobro del MEDS mientras que la figura 19 se refiere al recobro del SOALB. Se muestran los gráficos de probabilidad normal y el gráfico de superficie de respuesta estimada para la función de deseabilidad.

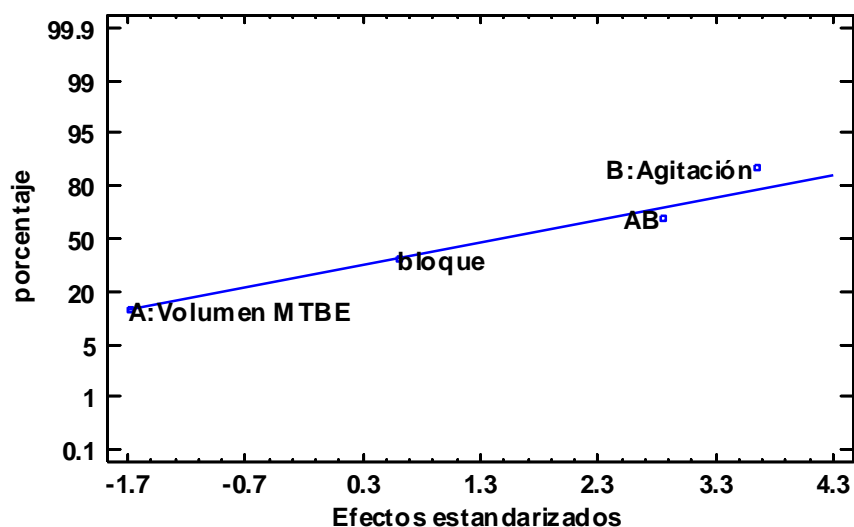


Figura 18. Gráfica de probabilidad normal para MEDS

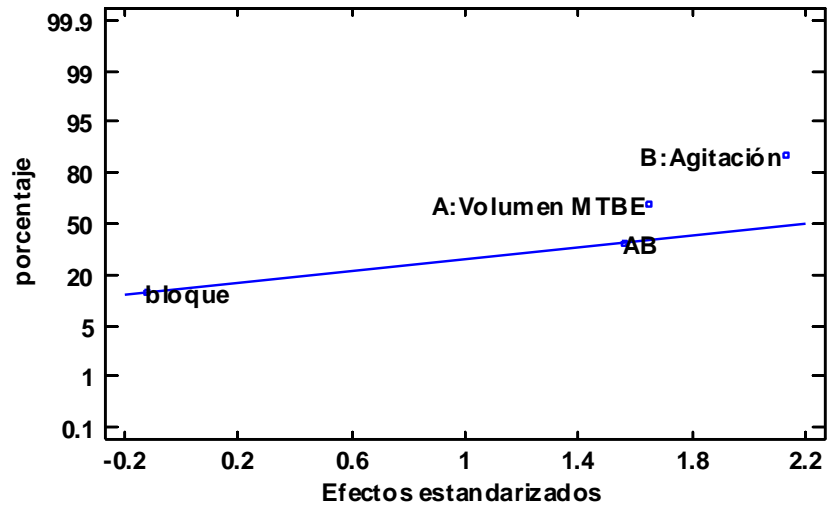


Figura 19. Gráfica de probabilidad normal para SOALB.

En las gráficas de probabilidad normal se observa cuáles son los factores estadísticamente significativos que afectan la respuesta medida, en este caso, el recobro. En ambos casos, la agitación es significativa ya que no se ajusta a la línea de normalidad. Además, en el caso del SOALB, el volumen de disolvente resultó ser significativo también.

Una vez analizadas por separado, se utilizó la función de deseabilidad para encontrar las condiciones con las que se obtenía el mejor recobro para ambas moléculas. Dicha función permite encontrar las condiciones experimentales que aseguren que todas las respuestas presenten un valor óptimo y puede tomar 3 diferentes formas dependiendo si será maximizada, minimizada o debe alcanzar un valor específico (Statgraphics, 2006).

Para poder calcular la deseabilidad, primero se debe ajustar cada respuesta a un modelo significativo de la forma:

$$Y = A_0 + A_1x_1 + A_2x_2 + \dots + A_{12}x_1x_2 + \dots + A_{11}x_1^2 + A_{22}x_2^2 + \dots + \varepsilon$$

Dicho modelo se obtiene tomando en cuenta el impacto que tienen los factores evaluados sobre la respuesta. Posteriormente se debe calcular la deseabilidad individual, tomando en cuenta cual es el objetivo: maximizar, minimizar o llegar a un valor. En este caso, se utilizó la función para maximizar las respuestas, para lo cual se empleó la siguiente ecuación:

$$d = \begin{cases} 0 & y < a \\ \left(\frac{y-a}{b-a}\right)^s & a < y < b \\ 1 & y > b \end{cases}$$

donde d es deseabilidad, y es el valor predicho de la variable de respuesta, a y b son los valores mínimo y máximo de la respuesta obtenidos experimentalmente y s es un factor que indica cuanto énfasis se debe dar al criterio. Cuando $s = 1$, la deseabilidad se comporta linealmente de un valor de 0 en el punto a , a un valor de 1 en el punto b (Statgraphics, 2006).

Una vez con esto se puede calcular la deseabilidad global (D) como la media geométrica de las deseabilidades individuales con la siguiente ecuación:

$$D = \{d_1 d_2 \dots d_m\}^{1/m}$$

Para poder obtener un gráfico en 3D de la función deseabilidad como función de dos factores, se debe calcular la deseabilidad global para cada una de las combinaciones de los niveles de cada factor. En la figura 20 se muestra el gráfico obtenido para las variables aquí tratadas, donde se observa que las condiciones óptimas son 5 mL de disolvente y 5 minutos de agitación.

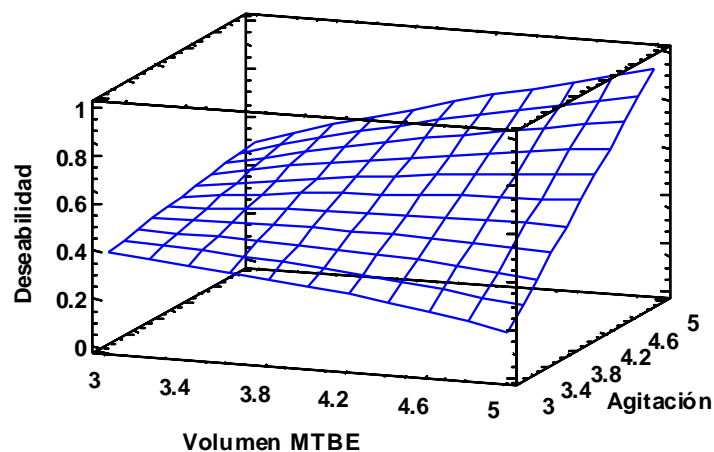


Figura 20. Gráfico de superficie de respuesta estimada.

Una vez establecidas estas condiciones, se logró contar con un método optimizado, el cual se muestra en el diagrama 3.

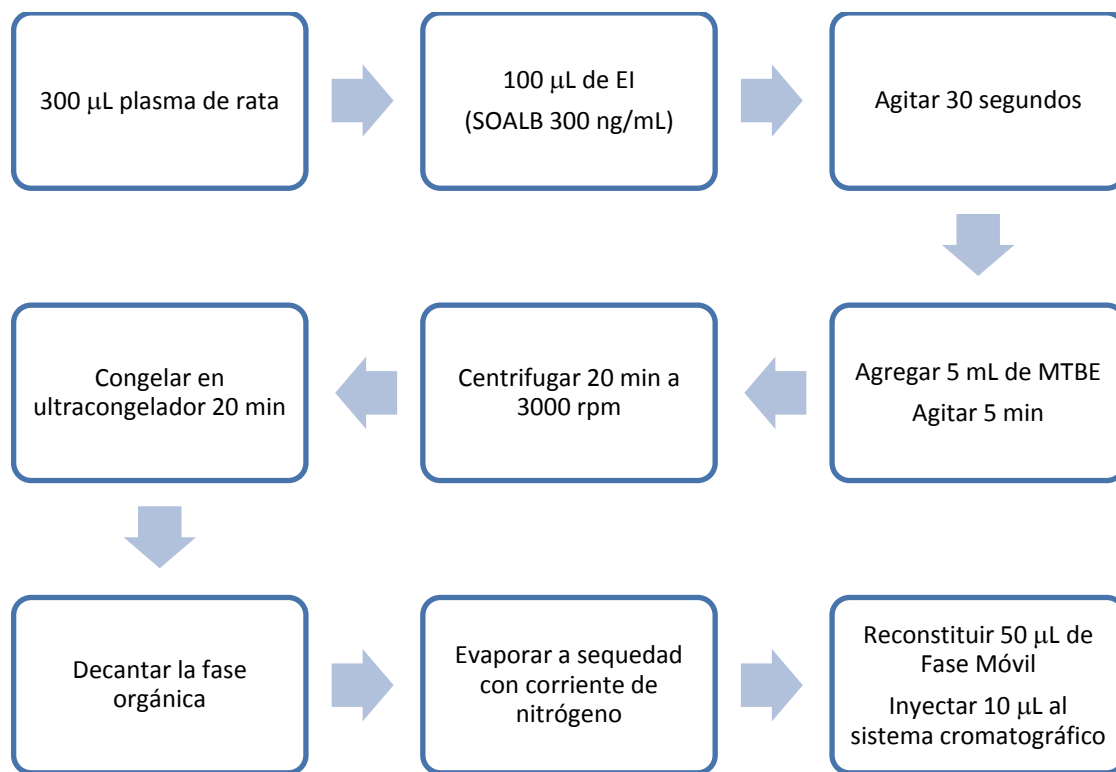


Diagrama 3. Método de extracción empleado en el estudio.

5.1.5 Condiciones cromatográficas

Columna: Gemini C18, 5 µm, 150 x 4.6 mm

El tipo de columna empleado fue el mismo que el usado en el método previamente desarrollado. Esta fue elegida por ser no polar, igual que la molécula de interés. Se le añadió una precolumna para el cuidado de la columna analítica.

Precolumna: Phenomenex C18

Se eligió por estar empacada con la misma fase estacionaria que la columna analítica y con el objetivo de proteger a la misma.

Flujo: 0.8 mL/min

El flujo se seleccionó tomando como base el método anterior, pero se modificó de manera que la forma del pico fuera simétrica

Tiempo de corrida: 4 min

Se eligió tomando en cuenta los tiempos de retención de las moléculas. Aunque con las condiciones cromatográficas establecidas los tiempos de retención fueron de 2.73 para el MEDS y de 2.48 para el SOALB, la corrida analítica se alargó hasta 4 minutos para permitir que eluyeran los componentes de la matriz.

Detección: modo positivo, tipo de escaneo: MRM (Multiple Reaction Monitoring)

Las condiciones óptimas permitieron obtener picos bien definidos y resueltos de ambos compuestos. Un ejemplo de ello se muestra en la figura 21.

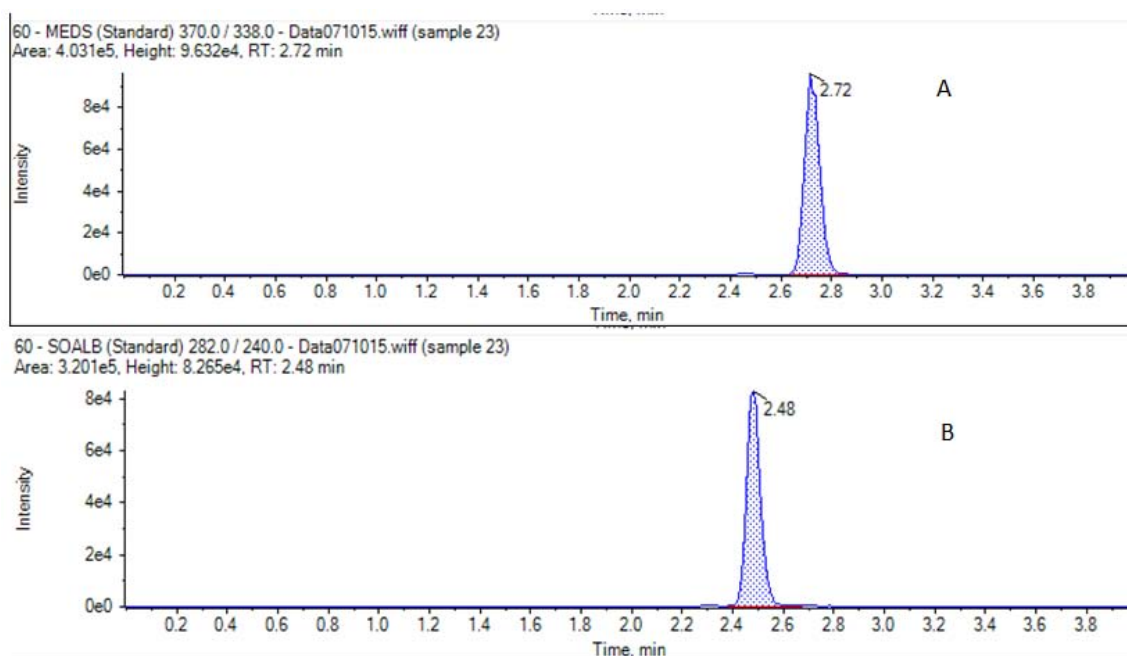


Figura 21. Cromatograma típico de una muestra de plasma obtenido con el método desarrollado. **A)**MEDS (60 ng/mL), **B)**SOALB

5.2 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

5.2.1 Selectividad

En este caso sólo se evaluó la matriz normal y matriz hemolizada, ya que se esperaba que los animales de experimentación fueran sanos, no presentaran lipemia, ni fueran administrados con otros medicamentos que pudieran interferir en el análisis.

En la figura 22 se muestra un cromatograma típico de una muestra blanco donde se observa la señal de ruido del detector. Además, en la tabla 24 se puede ver que la respuesta analítica de los blancos cumple con los criterios especificados, es decir, ser menores a 20 % de la señal del LC y menores al 5 % para el EI.

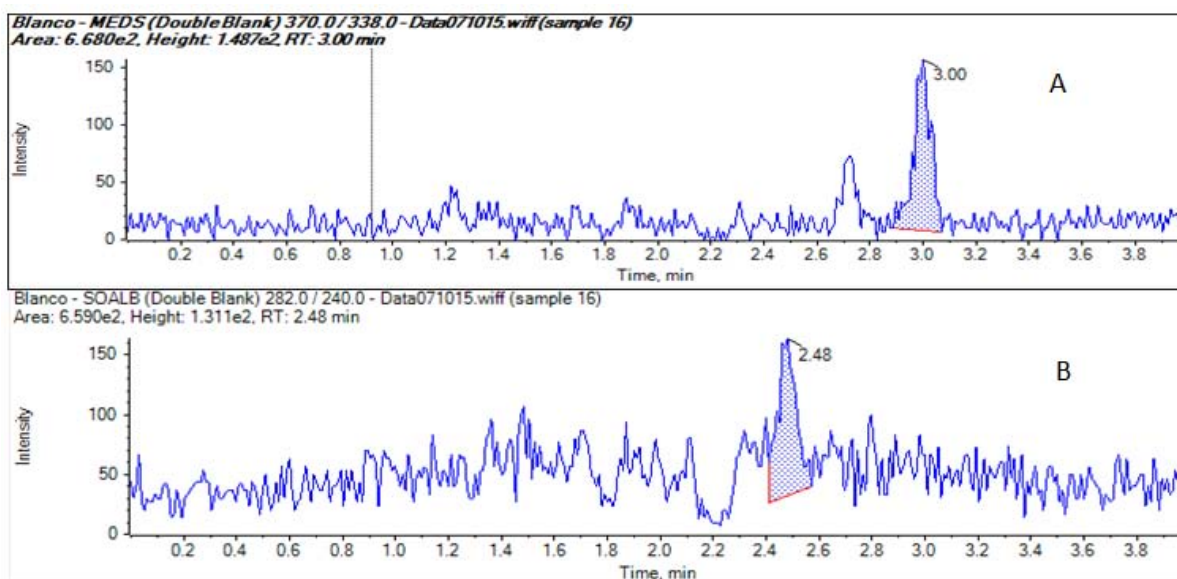


Figura 22. Cromatograma típico de muestra blanco. **A)** señal de MEDS, **B)** señal de EI

Tabla 24. Respuesta analítica de los blancos

Tipo de blanco	% LC	% EI	Tipo de blanco	% LC	% EI
Normal	0.15	0.057	Hemolizado	3.56	0.043
Normal	0.38	0.087	Hemolizado	2.31	0.039
Normal	0.33	0.11	Hemolizado	2.54	0.042
Normal	0.49	0.056	Hemolizado	2.52	0.072
Normal	2.84	0.058	Hemolizado	2.34	0.15
Normal	0.16	0.13	Hemolizado	2.26	0.056

5.2.2 Acarreo

Para la evaluación de este efecto se hicieron 3 inyecciones de muestras blanco en el siguiente orden: blanco, límite superior de cuantificación y dos blancos después de la inyección del límite superior de cuantificación. Todos los blancos mostraron señales menores al 20 % del LC de MEDS y menores al 5 % para la respuesta del EI, tal como se muestra en la tabla 25. Con ello se confirma que no existe efecto de acarreo en el método desarrollado.

Tabla 25. Respuesta de los blancos en la prueba de acarreo

Muestra	% LC	% EI
Blanco 1	0.19	0.052
Blanco 2	0.56	0.043
Blanco 3	0.12	0.058

5.2.3 Efecto de matriz

La ionización por electrospray es susceptible a errores en la cuantificación debidos a los componentes de la matriz. A este efecto se le conoce como efecto de matriz y suele producir aumento o supresión en la señal producida por los analitos en el detector. Principalmente es generado por la extracción de fosfolípidos presentes en el plasma. Dichos fosfolípidos están presentes en altas concentraciones en el fluido biológico y pueden ocasionar problemas en la ionización, en la retención y elevación de la línea base (Ismail, O., 2008).

Existen tres formas de eliminar los efectos de matriz. Uno es por medio de la separación cromatográfica de los fosfolípidos y los analitos. La segunda es mediante el uso de un estándar interno isotópico. La tercera opción es mediante la remoción de los componentes de la matriz durante el proceso de extracción (Jemal, M., 2009).

Existen diferentes métodos de extracción como son precipitación de proteínas, extracción líquido-líquido (ELL), extracción en fase sólida (SPE), entre otros. Algunos de estos métodos permiten eliminar una mayor cantidad de elementos de la matriz. En general, se ha demostrado que la ELL produce extractos muy limpios si se optimiza adecuadamente, generando extractos similares a los obtenidos con SPE (Jemal, M., 2009).

Como se menciona en el apartado de extracción del disolvente de extracción, se trató de obtener una metodología con la cual se extraiga poca cantidad de fosfolípidos; sin

embargo, es importante evaluar dicho efecto para asegurar que el método funciona adecuadamente.

Para la evaluación, se utilizó el método de adición post-extracción, en el cual se extraen blancos de plasma y posteriormente se reconstituyen con una solución que contiene al analito de interés y al EI. Se calculó el Factor de Matriz Normalizado (FMN) y su % CV. Al igual que para la selectividad, sólo se evaluaron el plasma normal y el hemolizado. Se encontró que aunque sí existe efecto de matriz ya que el FMN es diferente a 1, esto no afecta a la precisión, obteniendo % CV menores a 15 que es el límite establecido. Estos resultados se pueden ver en la tabla 26.

Tabla 26. % de efecto de matriz y FMN para cada tipo de blanco

	Normal		Hemolizado	
	PCB	PCA	PCB	PCA
FMN	1.12	1.19	1.12	1.35
DE	0.051	0.041	0.022	0.062
% CV	4.49	3.47	1.96	4.58

n= 6

De esta manera se demuestra que el método desarrollado es efectivo y que la combinación de un estándar interno y una extracción selectiva hacen que el efecto de matriz no genere problemas en la precisión.

5.2.4. Recobro

El recobro se evaluó con los puntos control bajo y alto con el fin de valorar si existía la misma recuperación del MEDS en el intervalo de trabajo. Para esto, se evaluó la normalidad y las varianzas de los datos, encontrando que los datos provienen de una distribución normal y que tienen varianzas iguales. Por tanto, se hizo una prueba de t de student para comparar las medias hallando los siguientes resultados:

H_0 : recobro PCB = recobro PCA

H_1 : recobro PCB \neq recobro PCA

$t_{0.05} = 2.00084$ valor $P = 0.08041$

Por lo que se concluye que no se puede rechazar H_0 .

De esta manera se comprueba que el recobro del MEDS es el mismo en todo el rango de trabajo y que presenta un %CV menor al 15 %, lo cual indica que es repetible.

Tabla 27. Recobro del SOALB y del MEDS en PCB y PCA.

	PCB	PCA	
	MEDS	MEDS	SOALB
Recobro (%)	78.77	70.89	70.55
DE	4.78	7.38	3.33
CV	6.06	10.42	4.73

n= 5

5.2.5 Límite de cuantificación

Se seleccionó tomando como base la concentración plasmática máxima encontrada de MEDS en un estudio previo en animales. Se eligió una concentración de 1.5 ng/mL. Para asegurar que la cuantificación de este punto fuera repetible se analizó dicho punto por quintuplicado y se determinó su %CV que fue de 6.0 %. Dado que este fue menor a 10 %, se concluyó que era repetible.

5.2.6 Linealidad

El rango de la curva de calibración evaluado fue de 1.5 – 100 ng/mL de MEDS en plasma. En la figura 23 se muestra una gráfica de la curva obtenida al graficar el factor de respuesta (área de MEDS/área del EI) vs la concentración nominal de MEDS. En ella se observa también la ecuación de la regresión lineal de la recta obtenida por mínimos cuadrados de acuerdo a la ponderación 1/x que fue a la que mejor se ajustaron los datos. En la tabla 28 se muestra la pendiente (m), ordenada al origen (b) y coeficiente de correlación (r) de las 6 curvas evaluadas.

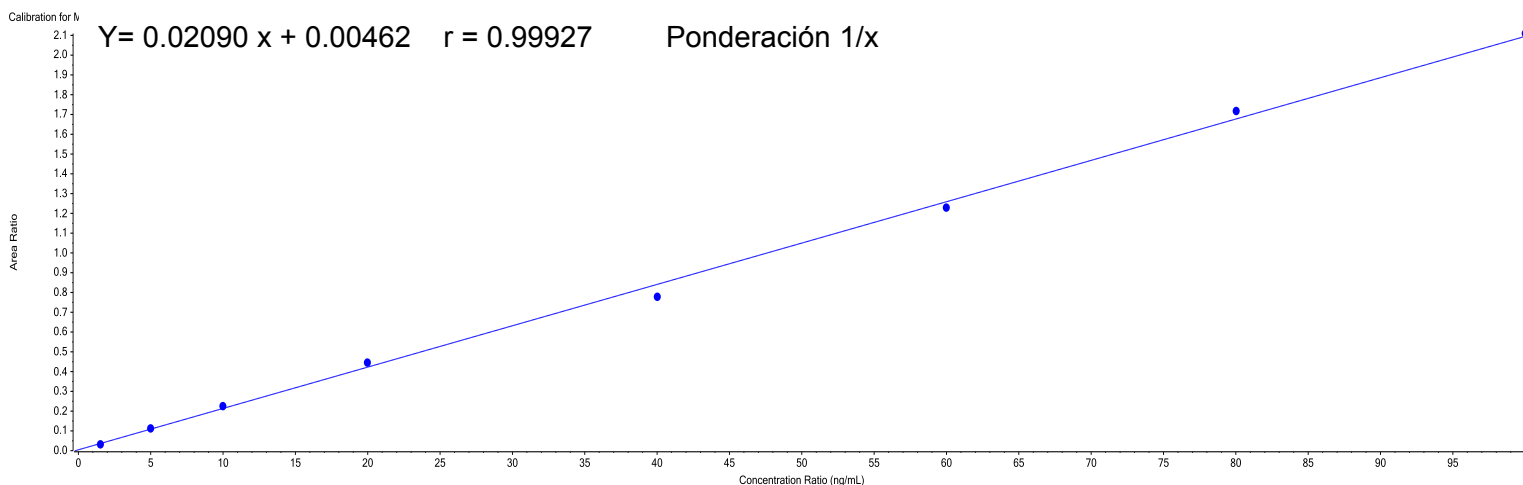


Figura 23. Curva de calibración de MEDS

Tabla 28. Valores de m, b y r para las 6 curvas evaluadas para la linealidad.

Parámetro	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
m	0.02090	0.02319	0.02441	0.02148	0.02297	0.02569
b	0.00462	0.00474	0.00151	0.00307	-0.00119	-0.00414
r	0.99927	0.99786	0.99966	0.99969	0.99907	0.99765

Por último, en la tabla 29 se muestra el % de desviación de la concentración calculada con respecto a la concentración nominal de cada punto de las 6 curvas evaluadas. En ella se observa que ninguno de los puntos sobrepasa el 15 % de desviación y que en el caso del límite de cuantificación no fue mayor al 20 %, con lo que se concluye que el método es lineal en el intervalo de 1.5 -100 ng/mL.

Tabla 29. % de desviación absoluta de la concentración calculada con respecto a la concentración nominal de MEDS

Concentración (ng/mL)	% desviación absoluta					
	curva 1	curva 2	curva 3	curva 4	curva 5	curva 6
1.5	6.91	18.51	3.29	0.16	4.03	18.03
5	3.32	7.02	2.41	4.67	1.18	2.39
10	4.98	2.98	2.08	0.59	3.11	5.79
20	4.84	7.27	1.1	3.17	1.48	6.2
40	7.21	0.09	0.13	2.35	0.99	11.94
60	2.18	9.86	4.65	0.74	6.69	0.74
80	2.46	4.14	0.68	2.07	4.87	7.72
100	0.69	4.39	1.8	2.61	0.21	0.18

5.2.7 Precisión y exactitud

En las tablas 30 y 31 se muestran los datos de % CV para la repetibilidad y la reproducibilidad intermedia. De igual forma, se presenta el % de desviación promedio de los datos empleados para el cálculo de la precisión. En ellos se observa que el método es preciso y exacto, ya que se obtienen %CV y desviaciones promedio menores al 15 %.

Tabla 30. Precisión del método desarrollado

	C agregada (ng/mL)	Repetibilidad (n = 5)			Precisión intermedia (n = 10)		
		C calculada promedio (ng/mL)	DE	% CV	C calculada promedio (ng/mL)	DE	% CV
LC	1.5	1.58	0.05	3.26	1.58	0.05	3.20
PCB	4	4.20	0.24	5.70	4.24	0.19	4.43
PCM	50	53.53	2.20	4.11	51.94	2.69	5.19
PCA	90	94.98	3.61	3.81	97.23	3.92	4.03

Tabla 31. Exactitud del método desarrollado

	% de desviación absoluta							
	LC		PCB		PCM		PCA	
	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2	Día 1	Día 2
	5.40	2.67	2.35	8.58	12.66	4.20	12.33	7.49
	7.00	6.80	2.58	5.38	7.88	3.04	6.91	10.88
	0.067	9.13	6.28	11.53	11.76	0.50	6.03	9.99
	10.20	7.87	14.00	6.23	4.36	4.36	1.29	14.11
	6.40	4.27	4.15	2.65	2.90	3.72	1.84	12.78
Promedio	5.31		6.37		5.29		8.03	

5.2.8 Estabilidad

Se evaluó la estabilidad de la muestra procesada en refrigeración y en automuestreador, la estabilidad en plasma a largo plazo por 15 días y la estabilidad de la solución stock. Estas condiciones fueron elegidas por ser a las que se pensaba someter a las muestras. En la tabla 32 se muestra el % de la concentración obtenida de cada punto después de ser sometido a las condiciones de estabilidad respecto a la concentración nominal, la cual se obtuvo al interpolar las respuestas en una curva de calibración.

Tabla 32 Porcentaje de la concentración obtenida respecto a la concentración nominal en la evaluación de la estabilidad de MEDS en diferentes condiciones.

Condiciones de estabilidad	PCB (4 ng/mL)	PCA (90 ng/mL)
Muestra procesada en refrigeración por 24 h.	102.69	105.36
Muestra en automuestreador 2.5 h	110.84	105.99
Muestra en plasma a -70 °C por 15 días	89.50	97.86
Solución Stock de MEDS en refrigeración 3 meses	102.99	
Solución Stock de MEDS en refrigeración 7 meses	141.55	
Solución Stock de MEDS en refrigeración 8 meses	143.45	

n= 3

Dado que todos los valores se encontraron entre el $\pm 15\%$ de la concentración nominal se concluyó que las muestras procesadas fueron estables en refrigeración por 24 h y en el automuestreador por 2.5 h. De igual forma, las muestras en plasma fueron estables por 15 días guardadas en congelación a -70°C .

Dado que el % de desviación de las soluciones de MEDS almacenadas en refrigeración por 7 y 8 meses fue mayor al 10 %, se demuestra que la solución de MEDS no es estable durante este tiempo. Sin embargo, si fue estable por 3 meses almacenada bajo las mismas condiciones.

5.3 Estudio de farmacocinética

El método analítico desarrollado fue empleado para la cuantificación de las muestras obtenidas del estudio de farmacocinética en ratas. En la tabla 33 se muestran los valores promedio de concentración plasmática de MEDS a cada tiempo de muestreo junto con su desviación estándar después de la administración de una dosis oral única de 20.86 mg/kg de peso corporal. Asimismo, en la figura 24 se muestra la representación gráfica de los datos.

Haciendo un análisis de qué tan adecuado fue el experimento, se encuentra que el último dato de concentración evaluado a las 30 h es aproximadamente el 10 % del C_{max} , por lo que el tiempo de muestreo fue correcto. Lo mismo ocurre tomando en cuenta el dato de $t_{1/2}$, ya que el muestreo debía ser de 4 vidas medias para poder realizar el cálculo de la constante de eliminación.

Tanto en la tabla 33 como en la figura 24 se observa que los niveles plasmáticos encontrados de la molécula en plasma fueron bajos. Esto puede deberse a que el

compuesto es poco soluble y por tanto, no se encuentra totalmente disponible para su absorción. Otra posibilidad es que el MEDS sufra de un extenso metabolismo de primer paso, ocasionando que la molécula intacta llegue en baja cantidad al torrente sanguíneo.

Tabla 33. Concentración plasmática promedio de MEDS obtenida después de la administración de una dosis de 20.86 mg/kg de MEDS en ratas.

Tiempo (h)	Concentración plasmática (ng/mL)
1.5	8.98 ± 6.37
3	16.05 ± 5.32
5	29.07 ± 11.95
6	29.36 ± 11.98
7	48.50 ± 17.91
9	33.29 ± 15.14
12	35.04 ± 12.99
24	12.85 ± 8.66
30	4.14 ± 2.12

Los valores se presentan como promedio ± DE. n = 5

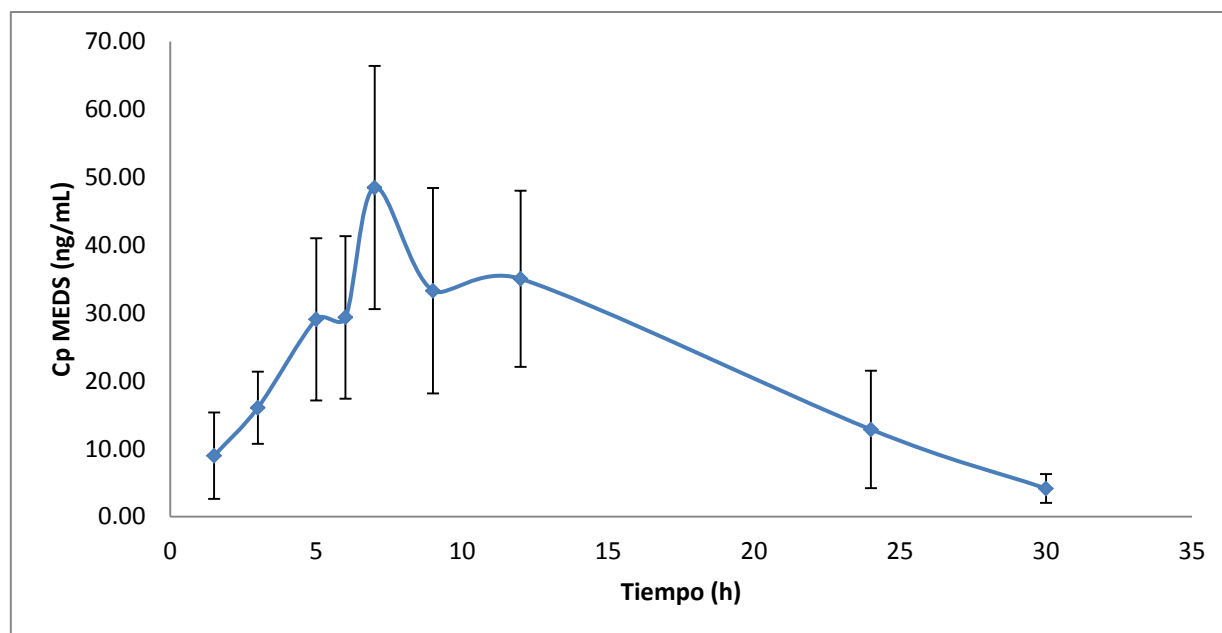


Figura 24. Perfil de concentración en función del tiempo de MEDS después de la administración de una dosis de 20.86 mg/kg. Cada punto representa promedio ± DE (n = 5)

En cuanto a los parámetros farmacocinéticos, los resultados obtenidos empleando un modelo no compartimental, se presentan en la tabla 35. En ellos se observa que el compuesto MEDS se absorbe de manera lenta ya que el t_{max} se alcanzó hasta las 7 horas. Esto mismo se confirma con el hecho de que a la media hora las concentraciones plasmáticas aún se encontraban debajo del límite de cuantificación del método desarrollado. Además, su tiempo de vida media es de 6 h aproximadamente, siendo un valor adecuado ya que permite una adecuada dosificación sin tener que ser muy frecuente (Lin, J.H., 1997).

Tabla 34. Parámetros farmacocinéticos de MEDS calculados

Perfil	C_{max} (ng/mL)	t_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	$AUC_{(0-t)}$ (h*ng/mL)	$TMR_{(0-t)}$ (h)
1	34.08	7	5.46	323.07	10.74
2	39.71	7	4.93	488.33	11.17
3	47.83	6	6.21	698.24	12.51
4	50.05	7	6.56	746.14	12.51
5	78.83	7	7.11	1045.92	12.69
Promedio	50.1	6.8	6.06	660.34	11.93
DE	17.29	0.45	0.87	274.23	0.901

Por otro lado, observando el perfil farmacocinético del MEDS, se ve la aparición de dos picos. Esto puede ser explicado por diferentes circunstancias: a) Que al igual que el albendazol, la solubilidad del compuesto MEDS en el intestino aumente en presencia de los ácidos biliares secretados después de la ingestión de alimentos, la cual fue a las 5 horas después de la administración. b) Que el proceso de solubilización sea errático y lento en el tracto gastrointestinal (Sotelo, J., 1998). c) Que la molécula tenga varios sitios de absorción durante su paso a través del tracto gastrointestinal del animal.

Otra explicación podría ser la presencia de recirculación enterohepática. Este proceso ocurre cuando la molécula en el torrente sanguíneo es sustraída por los hepatocitos y posteriormente eliminada en la bilis. Cuando esta última es excretada hacia el intestino, la molécula vuelve a encontrarse disponible para reabsorberse (Roberts, M., 2002).

Los compuestos hidrosolubles tienen mayor posibilidad de ser excretados a través de la vía biliar, ya que la bilis es un líquido acuoso que puede formar micelas con los ácidos biliares. El peso molecular mínimo necesario para que se presente recirculación enterohepática en ratas es de 200 a 325 g/mol. En la bilis puede excretarse el fármaco libre o conjugado después de reacciones de fase II (Roberts, M., 2002).

El MEDS cumple con la característica del peso molecular para la excreción vía biliar. Además, es posible que tenga un metabolito más polar debido a una reacción de nitro-reducción, seguida de una conjugación con ácido glucurónico en el grupo amino resultante, con lo cual aumentaría la probabilidad de que sea eliminado por esta ruta. Por otro lado, los compuestos con recirculación enterohepática suelen caracterizarse por presentar bajas concentraciones plasmáticas, tal como ocurre con la molécula analizada. Cabe mencionar que la recirculación enterohepática puede afectar significativamente los parámetros farmacocinéticos, en especial el tiempo de vida media y el área bajo la curva (Roberts, M., 2002). Este puede ser el motivo de que el tiempo de vida media sea muy similar al t_{max} , lo cual podría dar lugar a que el cálculo de la constante de eliminación no sea adecuado. De igual forma, la alta variabilidad encontrada en los datos de MEDS aquí mostrados puede ser debida a la misma causa. Sumado a esto, otra fuente de variabilidad en los datos es el hecho de que se emplearon varios animales para crear un solo perfil farmacocinético.

Considerando que la nueva molécula posee propiedades fisicoquímicas similares a las del albendazol, el extenso metabolismo podría generar el perfil obtenido, tal como se observa en el estudio de farmacocinética de ABZ en humanos a una dosis de 400 mg de Wojnics, A., *et al.* 2013. En él, se encontró que los niveles plasmáticos de albendazol tras una sola administración fueron mucho menores que los de su metabolito activo, SOALB, tal como se observa en la siguiente tabla.

Tabla 35. Parámetros farmacocinéticos de ALB y SOALB tras una dosis de 400 mg (Wojnics, A., *et al.*, 2013)

Parámetro	ABZ	SOALB
C_{max} (ng/mL)	57.49±52.28	829.95±439.91
T_{max} (h)	1.75±1.0-4.5	3.5±2.0-5.5
$T_{1/2}$ (h)	2.04±1.11	12.56±4.20
AUC_{0-t} (ng x h/mL)	154.08±161.76	8125.43±4761.41
$AUC_{0-\infty}$ (ng x h/mL)	218.49±168.72	9867.16±6180.90

Por último, se llevó a cabo la comparación entre los parámetros farmacocinéticos del MEDS y los del SOALB previamente obtenidos en ratas por el mismo grupo de trabajo (Ruiz, M. I., 2011), para lo cual, las unidades se expresaron en nmol/L. La tabla 36 muestra dicha comparación. En ella se puede observar que el C_{max} , del MEDS fue 50

veces menor al alcanzado para el SOALB. De igual forma, el AUC fue 32 veces menor. Esto podría indicar que la cantidad de MEDS absorbida es menor respecto a la del albendazol o bien que el MEDS presenta un extenso efecto de primer paso, sin embargo sería necesario llevar a cabo otros estudios para determinar cual es el factor predominante. En cuanto a la comparación del tiempo medio de residencia (TMR), se realizó una prueba estadística, para lo cual se evaluó la normalidad y las varianzas de los datos. Se concluyó que los datos provienen de una distribución normal y que tienen varianzas iguales. Entonces se realizó una prueba de t de student para comparar las medias encontrando los siguientes resultados

H_0 : TMR MEDS = TMR SOALB

H_1 : TMR MEDS \neq TMR SOALB

$t_{0.05} = -4.86254$ valor $P = 0.00125175$

Por lo que se rechaza H_0 y se demuestra que el MEDS permanece de manera estadísticamente significativa más tiempo en el cuerpo comparado con el SOALB.

Tabla 36. Parámetros farmacocinéticos de SOALB y MEDS tras una administración equimolar a ratas.

	SOALB			MEDS		
	Cmax (nmol/L)	AUC (h*nmol/L)	TMR (h)	C max (nmol/L)	AUC (h*nmol/L)	TMR (h)
	8535.73	61196.58	7.19	92.36	875.53	10.74
	5748.83	62323.31	8.31	107.62	1323.38	11.17
	4530.64	45091.99	10.47	129.62	1892.24	12.51
	10178.08	63079.79	6.75	135.64	2022.07	12.51
	5692.42	54371.57	8.42	213.63	2834.46	12.69
Promedio	6937.14	57212.65	8.23	135.77	1789.54	11.93
DE	2335.16	7605.85	1.44	46.84	743.17	0.90

6. CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico para la cuantificación del compuesto {5-[(4-nitrobenzil)carbamoil]-1H-bencimidazol-2-il}carbamato de metilo (MEDS) en plasma rata empleando la técnica de LC-MS/MS.

El método desarrollado fue selectivo, lineal, preciso y exacto en un rango de concentraciones de 1.5 – 100 ng/mL. Además, no presentó efecto de acarreo y la precisión no se vio afectada por efecto de matriz.

Las muestras de MEDS en plasma fueron estables en congelación a -70 °C durante 15 días

Las concentraciones plasmáticas de MEDS tras la administración de una dosis oral única de 20.86 mg/kg en ratas fueron bajas, lo cual puede atribuíse a la baja solubilidad o al extenso metabolismo de molécula.

Se encontró que el compuesto MEDS se absorbe de manera lenta en el tracto gastrointestinal, mostrando un t_{max} de 6.8 h.

La vida media de eliminación del MEDS fue de 6.06 h, considerándose buena para una adecuada administración.

Asimismo se encontró la presencia de varios picos que indican una posible recirculación enterohepática.

Comparando el Tiempo medio de residencia del MEDS con el del SOALB en el mismo modelo animal se halló que el MEDS permanece más tiempo en la rata.

7. PERSPECTIVAS

Realizar estudios para determinar el metabolismo del MEDS

Determinar si el doble pico del MEDS está asociado a recirculación enterohepática

Determinar la permeabilidad del MEDS.

Desarrollar un método analítico que pueda emplear un menor volumen de muestra, de manera que puedan obtenerse perfiles completos de un solo animal.

8. REFERENCIAS

Cabello, R. (2007). Microbiología y Parasitología Humana. Tercera edición, *Edit. Médica Panamericana*, México, pp. 1479-1482

Campbell, W. and R. Rew (1986) Chemotherapy of Parasitic Diseases. *Plenum Press*. New York, pp. 239-340

Carpio, A., Fleury, A. and W. A. Hausser, (2013). Neurocysticercosis. Five new things. *Neurology Clinical Practice*. 118-125

Chambers, E., Wragowski, D., Lu, Z. and J. Mazzeo (2007) Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B*, 852: 22-34

Crawford Scientific (2007) Incidencias y Mantenimiento en HPLC, traducido por Grupo Biomaster, en línea, recuperado el día 4 de Septiembre de 2015

Del Bruto, O. H., (2005). Neurocisticercosis: actualización en diagnóstico y tratamiento. *Neurología*. 20(8), 412-418

Del Bruto, O. H, (2006). Meta-Analysis: Cysticidal Drugs for Neurocysticercosis: Albendazole and Praziquantel. *Annals of Internal Medicine*. 145(1), 43-51

Drug Bank, en línea: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00518>, revisado el día 5 de Noviembre de 2015

Fernández, E. R., & Moraga, A. G. (2006). Neurocisticercosis e inmigración. *SEMERGEN-Medicina de Familia*, 32(2), 87-89.

Fleury, A., Jung, H., Cardenas, G., & Sciutto, E. (2008). Medical treatment for neurocysticercosis: drugs, indications and perspectives. *Current topics in medicinal chemistry*, 8(5), 424-433.

Fleury, A., Sciutto, E. and C. Larralde, (2012). Neurocysticercosis is still prevalent in Mexico. *Salud Pública de México*. 54(6), 632-636

Fleury, A., Moreno, J., Valdez, P., de Sayve, M., Becerril, P., Larralde, C. and E. Sciutto (2010) Neurocysticercosis, a Persisting Health Problem in Mexico. *Neglected tropical diseases*. 4(8), 1-3

Gosh, C. and B. Chakraborty (2012) LC-MS Methods for Regulated Bioequivalence Studies: Do we Need to Worry about Matrix Effects? *Open Access Scientific Reports*. 1(9), 2-7

Hager, J. W. and Yves Le Blanc, J. C. (2003), Product ion scanning using a Q-q-Q_{linear ion trap} (Q TRAP™) mass spectrometer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17: 1056–1064.

Imirizaldu, L., Miranda, L., García, I., Gastón, I., Urriza, J. y P. Quesada, (2004). Neurocisticercosis. Una enfermedad emergente. *An. Sist. Sanit. Navar*. 27(2), 201-209

Ismail, O., Halquist, M., Elmamly, M., Shalaby, A. and T. Karnes (2008) Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations. *Journal of Chromatography B*. 875: 333-343

Jemal, M., Ouyang, Z. and Y. Xia (2009) Systematic LC-MS/MS bioanalytical method development that incorporates plasma phospholipids risk avoidance, usage of incurred sample and well thought-out chromatography. *Biomedical chromatography*. 24: 2-19

Juarez, V., (2011) Evaluación de la actividad cisticida de nuevos análogos de albendazol. *Tesis*. UAM Unidad Xochimilco

Jung, H. (2012). Pharmacokinetic variability of anthelmintics: implications for the treatment of neurocysticercosis. *Expert Rev. Clin. Pharmacol*. 5(1), 21-30

Jung, H., Medina, L., García, L., Fuentes, I. and R. Moreno (1998) Absorption Studies of Albendazole and some Physicochemical Properties of the Drug and Its Metabolite Albendazole Sulphoxide. *J. Pharm. Pharmacol.* 50: 43-48

Lin, J.H. and A.Y.H. Lu (1997) Role of Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Discovery and Development. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 49: 403-440

Melchor, S.P., (2011) Síntesis de derivados de carbendazim y nicotinamida como compuestos de acción antiparasitaria. *Tesis.UNAM*

Mendez, N. (2008) Farmacología médica. *Edit. Medica Panamericana.* México. Pp. 139-144

Meza, A. y F. Aguilar, (2002). Teniasis humana por *Taenia solium*. *Revista Mexicana de Patología Clínica.* 49(2), 92-99

Monzote, L. and A. Siddiq, (2011). Drug Development to Protozoan Diseases. *The Open Medicinal Chemistry Journal.* 5, 1-3

Norma Oficial Mexicana, NOM 177-SSA1-2013 Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. En línea. Obtenida el día 20 de Diciembre de 2015

Plasencia, G. (2003) Espectrometría de masas, Instituto de Biotecnología, UNAM, en línea, obtenido el día 11 de Noviembre de 2015

Roberts, M., Magnusson, B., Burczynski, F. and M. Weiss. Enterohepatic Circulation. Physiological, Pharmacokinetic and Clinical Implications. *Clinical Pharmacokinetic.* 41 (10): 751-790

Rodríguez, J., Seminario de Espectrometría de masas para usuarios del SUIC. *Agilent technologies.* En línea, recuperado el día 10 de Noviembre de 2015.

Ruíz, M. I. (2011) Estudio farmacocinético y neurofarmacocinético de la combinación de albendazol y nitazoxanida en plasma y líquido cefalorraquídeo. *Tesis*. UNAM

Ruiz, S., García-Vázquez, E., Picazo, R., Hernández, A., Herrero, J. A., & Gómez, J. (2011). La neurocisticercosis en Murcia. *Revista clinica espanola*, 211(3), 133-138.

Sigma Aldrich, Fluka Analytical. (2012) LC-MS. Mobile Phase Additives - Tips & Tricks.

Singh, G. and S. Prabhakar, (2002). *Taenia solium* Cysticercosis. From basic to clinical science. *Cabi Publishing*. UK. Pp. 1-10

Sotelo, J. and H. Jung (1998) Pharmacokinetic Optimisation of the Treatment of Neurocysticercosis. *Clinical Pharmacokinetic*. 34(6): 503-515

Sotelo, J. and O. Del Bruto, (2002). Review of Neurocysticercosis. *Neurosurg Focus*. 12 (6), 1-7

Statgraphics. (2006). Diseño de experimentos. Optimización de múltiples respuestas. *StatPoint, Inc*.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Veterinary Medicine (CVM) (2013). Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation

Velázquez, L., Cruz, J.L. and S.G. Juárez, (2004) Neurocisticercosis: algunos aspectos epidemiológicos de los casos diagnosticados en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. 1995-2001. *Rev Mex Neuroci*. 5(5), 426-433

Velázquez, L. and M. A. Ramírez, (2014). Enfermedades neurológicas de vigilancia y notificación obligatoria: tendencia y desenlace en un Instituto Neurológico del Sistema Nacional de Salud de la Ciudad de México, de 2005 a 2011. *Gaceta Médica de México*. 150, 540-551

Wallin, M. T., and Kurtzke, J. F. (2004). Neurocysticercosis in the United States Review of an important emerging infection. *Neurology*, 63(9), 1559-1564.

Wojnicz, A., Cabaleiro, T., Román, M., Ochoa, D., Abad, F. and A. Ruíz (2013) A simple assay for the simultaneous determination of human plasma albendazole and albendazole sulfoxide levels by high performance liquid chromatography in tandem mass spectrometry with solid-phase extraction. *Clinica Chimica Acta*. 426: 58-63