



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

***“DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN
SIMULTÁNEA DE TRICLABENDAZOL Y SUS METABOLITOS EN PLASMA
OVINO”***

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. WILLIAMS DAVID HERNÁNDEZ GARCÍA

DRA. HELGI HELENE JUNG COOK
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO DE 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

***“DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN
SIMULTÁNEA DE TRICLABENDAZOL Y SUS METABOLITOS EN PLASMA
OVINO”***

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. WILLIAMS DAVID HERNÁNDEZ GARCÍA

DRA. HELGI HELENE JUNG COOK
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA



Ciudad de México, junio de 2020.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE	M. en C. Juan Manuel Rodríguez
VOCAL	Dra. Raquel López Arellano
VOCAL	Dra. Rosa Ventura Martínez
VOCAL	Dr. Froylán Ibarra Velarde
SECRETARIO	Dra. Inés Fuentes Noriega

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO 112 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA, EN EL CONJUNTO “E” DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM).

TUTORA

DRA. HELGI HELENE JUNG COOK

SUSTENTANTE

Q.F.B. WILLIAMS DAVID HERNÁNDEZ GARCÍA

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, que a través del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas me dio la oportunidad de cumplir un sueño más.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para hacer posible la realización de este proyecto, con número de becario 626652.

A la Dra Helgi Jung Cook, quien desde hace más de cuatro años ha tenido la disposición de guiarme en este camino de la Biofarmacia. Gracias por enseñarnos tanto y por todo el apoyo de siempre, por creer en mí y por impulsarme a mejorar cada vez.

A la M. en C. Lourdes Mayet, que siempre estuvo en la mejor disposición de apoyarnos para resolver los problemas que se presentan y por la confianza depositada en mí.

Al Dr. Froylán Ibarra Velarde, a la Dra. Alicia Hernández Campos y al Dr. Rafael Castillo Bocanegra, por haberme incluido en el desarrollo de uno de sus proyectos más importantes hoy en día. También me llevo muchos aprendizajes de ustedes. Fue a través del proyecto PAPIIT IT201018 que se pudieron obtener los ovinos requeridos para la extracción del fluido biológico.

Al Dr. Miguel Flores Ramos, quien con su beca posdocotral otorgada por DGAPA sintetizó y brindó los estándares de sulfóxido de triclabendazol, sulfona de triclabendazol, el compuesto hidrosoluble MFR-33 (fosfatriclaben) y triclabendazol.

Al jurado asignado por el Comité Académico a través del SPIEM por el tiempo invertido en la revisión del documento y por sus valiosos aportes.

A mis padres, Isabel y Héctor. Gracias por nunca dejarme abandonar mis sueños, por siempre estar detrás de mí empujándome a ser mejor persona y por ser siempre una fuente de inspiración para seguir triunfando. Esto es por ustedes y para ustedes.

A mi abuela Socorro Kelly por nunca dejar de creer y confiar en mí, porque a pesar de cualquier circunstancia siempre pone su fe en mí.

A mis tíos Héctor y Cristina. Una vez más, gracias por abrirme las puertas de su casa y de su corazón. Gracias por enseñarme a amar fuera de límites.

A mis hermanos, Héctor y Grace. Por ser mis maestros y compañeros para la vida. Gracias por las experiencias y los consejos, por todas las palabras y demás. A mis hermanos postizos Teresita y Memo porque siempre están y siempre estarán.

A mis grandes amigos QFB's e IQ's. Con ustedes la vida se hace más llevadera, menos pesada y más bella, que dan ganas de vivirla por siempre. Ustedes son tanto para mí, que espero duremos un millón de años juntos.

A todos los compañeros del 112 por su compañía y solidaridad. Gracias Sergio Soto, José Becerril, Janet Pérez, Mara Sánchez, Julio Mena, porque nunca me dejaron caer en mis propias trampas, porque siempre me apoyaron para hacer las cosas bien y terminar con la cabeza en alto. Esto no se queda hasta aquí, yo sé que sigue para continuar escribiendo una gran amistad.

A todos los que siempre confiaron en mí y me dieron ánimos para seguir adelante y luchar por mis sueños. GRACIAS.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
LISTADO DE ABREVIATURAS	VII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.i. Triclabendazol	2
II.i.i. Generalidades	2
II.i.ii. Propiedades fisicoquímicas de interés.....	2
II.i.iii. Farmacocinética	3
II.i.iv. Farmacodinamia.....	4
III. JUSTIFICACIÓN	5
IV. HIPÓTEISIS	6
V. OBJETIVOS.....	6
V.i. Objetivo general	6
V.ii. Objetivos particulares	6
VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL	7
VI.i. Preparación de soluciones.....	7
VI.ii. Metodología experimental	8
VI.ii.i. Condiciones cromatográficas.....	8
VI.ii.ii. Condiciones de extracción.	9
VI.iii. Confiabilidad del método.....	10
VI.iv. Aplicación del Método para la Cuantificación de los analitos en Plasma Humano.....	12
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	13
VII.i. Condiciones cromatográficas.	13
VII.ii. Condiciones de extracción.	15
VII.iii. Confiabilidad del método.....	17
VII.iv. Aplicación del método en Plasma Humano.	23
VIII. CONCLUSIONES	25
IX. PERSPECTIVAS.....	25
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de interés de los metabolitos de TCBZ.....	3
Tabla 2. FM evaluadas para separación de analitos.	9
Tabla 3. Condiciones probadas para la extracción en fase sólida.....	10
Tabla 4. Condiciones analíticas para el análisis de muestras con TCBZ.....	15
Tabla 5. Recobro y determinación del método para SPE.....	16
Tabla 6. Porcentaje de interferencia de respuesta de muestras blanco.	18
Tabla 7. Reutilización de cartuchos.	19
Tabla 8. Suma de cuadrados de los residuales para cada modelo.	20
Tabla 9. Parámetros de linealidad para una curva de calibración con los diferentes modelos de ajuste.....	21
Tabla 10. Linealidad del método.	21
Tabla 11. Repetibilidad del método.....	22
Tabla 12. Reproducibilidad del método.....	23
Tabla 13. Exactitud del método.....	23
Tabla 14. Comparación de regresión lineal entre plasma ovino y humano.....	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del TCBZ.	2
Figura 2. Estructura química del TCBZ-SO ₂	3
Figura 3. Estructura química del TCBZ-SO.....	3
Figura 4. Espectros de absorción UV de los analitos.	13
Figura 5. Separación con columna Spherisorb.....	13
Figura 6. Separación con columna Zorbax.....	13
Figura 7. Cromatograma de una muestra blanco de plasma adicionada con CBZ.	14
Figura 8. Cromatograma de muestra LIC.....	17
Figura 9. Cromatograma de muestra LSC.	17
Figura 10. Cromatograma de una muestra blanco.	18
Figura 11. Cromatograma de una muestra LIC.....	18
Figura 12. Gráficos de Residuales para el modelo 1/x ²	20
Figura 13. Gráficos de Residuales para el modelo logarítmico.	20
Figura 14. Gráfico de la CC con el modelo log-log.....	21
Figura 15. Cromatograma de una muestra de LIC en plasma humano.	24
Figura 16. Gráfico de CC en plasma humano.	24

LISTADO DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius.	h	Hora(s).
%	Porcentaje o por ciento.	H ₂ O	Agua.
% v/v	Por ciento de volumen en volumen	HPLC	Del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i> : ver CLAR.
µg/mL	Microgramo por mililitro.	IC	Intervalo de Confianza.
µg	Microgramo.	i-PrOH	Isopropanol
µL	Microlitro.	LIC	Límite inferior de cuantificación.
\bar{X}	Promedio.	Log P	Coefficiente de partición.
>	Mayor que.	LSC	Límite superior de cuantificación.
≥	Mayor o igual que	m	Pendiente de la recta.
<	Menor que.	M	Concentración molar (molaridad).
≤	Menor o igual que.	MBZ	Mebendazol.
ABZ	Albendazol.	MCA	Muestra control alta.
ACN	Acetonitrilo.	MeOH	Metanol.
AcOH	Ácido acético	mg	Miligramo(s).
AcONH ₄	Acetato de amonio.	mg/mL	Miligramo por mililitro.
b	Intercepto (ordenada al origen).	min	Minuto(s).
BCS	Del inglés <i>Biopharmaceutic Classification System</i> : Sistema de Clasificación Biofarmacéutica.	mL	Mililitro(s).
CBZ	Carbamazepina.	mL/min	Mililitro por minuto.
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.	NH ₄ OH	Hidróxido de amonio.
C _{máx}	Concentración plasmática máxima.	nm	Nanómetros.
CV%	Por ciento de coeficiente de variación.	pKa	Logaritmo negativo de la constante de disociación ácida.
D.E.	Desviación Estándar.	r	Coefficiente de correlación.
d.i	Diámetro interno.	rpm	Revoluciones por minuto.
DMSO	Dimetil sulfóxido.	s	Segundos.
EI	Estándar Interno.	s.f.	Sin fecha.
FDA	Del inglés <i>Food and Drug Administration</i> .	ST	Solución de trabajo.
F.M.	Fase móvil.	t _{1/2}	Tiempo de vida media.
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.	TCBZ	Triclabendazol.
g	Gramo(s).	TCBZ-SO	Sulfóxido de Triclabendazol
g/mol	Gramo por mol.	TCBZ-SO ₂	Sulfona de Triclabendazol
		t _{máx}	Tiempo para alcanzar C _{máx} .
		t _R	Tiempo de retención.
		UV	Ultravioleta / Espectro ultravioleta.

I. INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es un padecimiento de importancia mundial que da lugar a pérdidas económicas por la baja de producción animal en ganadería. Es causado por trematodos del género *Fasciola*, siendo las especies más importantes *F. hepatica* y *F. gigantica*. Una estrategia para combatir esta enfermedad es el uso de antihelmínticos del tipo benzimidazol, siendo el triclabendazol una de las primeras opciones recomendadas por la OMS. Sin embargo, una de las limitantes de este fármaco es su baja solubilidad acuosa, por lo que es necesario desarrollar nuevas estrategias para el tratamiento de esta enfermedad.

Siendo así, en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química se sintetizó un profármaco hidrosoluble (fosfato di sódico) de triclabendazol para su uso por vía intramuscular, el cual ha demostrado presentar una eficacia del 100% empleando una dosis menor (6 mg/Kg) que el tratamiento convencional (suspensión oral, 12 mg/Kg) al administrarlo en borregos. A partir de esto, surge la necesidad de evaluar la biodisponibilidad relativa entre ambas formulaciones.

En el presente trabajo se describen los resultados obtenidos del desarrollo de un método analítico por HPLC-UV en fase reversa para la cuantificación de triclabendazol y sus metabolitos principales en plasma ovino, el cual será utilizado en el estudio de biodisponibilidad relativa del fosfato de triclabendazol inyectable respecto a la suspensión oral que se utiliza actualmente.

II. ANTECEDENTES

II.i. Triclabendazol

II.i.i. Generalidades

El Triclabendazol (TCBZ; figura 1) [6-cloro-5-(2,3-diclorofenoxy)-2-(metilsulfanil)-1H-benzimidazol] es un fármaco antihelmíntico benzimidazólico utilizado para el tratamiento de la fasciolosis, generalmente en ganado de consumo. Se diferencia de otros benzimidazoles con acción antihelmíntica por tener 3 cloros en su estructura y un grupo metil-tio en la posición 2-benzimidazol, donde moléculas como Albendazol (ABZ) o Mebendazol (MBZ) tienen un grupo carbamato (Fairweather y Boray, 1999).

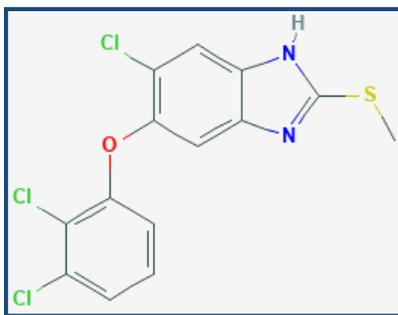


Figura 1. Estructura química del TCBZ.

En veterinaria, es el fármaco de elección para el tratamiento de este tipo de parasitosis en ganado de consumo, siendo administrado en una suspensión oral al 10% (Fasinex®, Novartis) a una dosis de 10-12 mg/kg dependiendo de la especie. A su vez, existen formulaciones en combinación de TCBZ-10% con Ivermectina (IVM)-0.6%, las cuales presentan mayor eficacia, ya que se presenta un efecto sinérgico por la combinación (Lifschitz y cols. 2009).

A inicios de 2019 la FDA aprobó el uso de triclabendazol en humanos para el tratamiento de fasciolosis en pacientes mayores a 6 años a una dosis de 20 mg/kg/día repartido en dos tomas de 10 mg/kg cada 12 h (Egaten®, tabletas de 250 mg, Novartis).

II.i.ii. Propiedades fisicoquímicas de interés

- Fórmula y Peso Molecular: $C_{14}H_9Cl_3N_2OS$; 359.65 g/mol.
- pK_a : 10.30 y 4.39, calculados en ChemAxon.
- Solubilidad: 0.00024 mg/mL en agua a 25 °C (Flores-Ramos y cols., 2017). Soluble en tetrahidrofurano, ciclohexanona, acetona, *i*-propanol, *n*-octanol y metanol; ligeramente soluble en diclorometano, cloroformo, tolueno, xileno y acetato de etilo; insoluble en agua y hexano (Dieter, 2012). 70 mg/mL en DMSO (ChemSpider, s.f.).
- Log P: 3.48, experimental (DrugBank, 2019).

II.i.iii. Farmacocinética

Después de administrar TCBZ vía oral en suspensión al 10% a bovinos, se observa que el rumen tiene un papel de reservorio temporal, lo que hace que la liberación hacia intestinos sea controlada y por tanto la absorción. Las concentraciones plasmáticas máximas encontradas para las especies sulfóxido y sulfona de TCBZ son de alrededor de 12.98 $\mu\text{g/mL}$ y 12.07 $\mu\text{g/mL}$, alcanzadas a las 29.0 h y 52.0 h respectivamente.

El TCBZ presenta un extenso metabolismo de primer paso, siendo rápidamente oxidado a los metabolitos sulfóxido y sulfona (figuras 2 y 3). La tabla 1 presenta algunas propiedades fisicoquímicas de interés de estas moléculas (Hennessy y cols. 1987; Royal Society of Chemistry, s.f.). Mestorino y colaboradores (2008) proponen que la formación del TCBZ-SO corresponde a un proceso de orden cero (dada la lenta liberación a partir del rumen y un intermitente flujo pilórico), mientras que su eliminación es de primer orden.

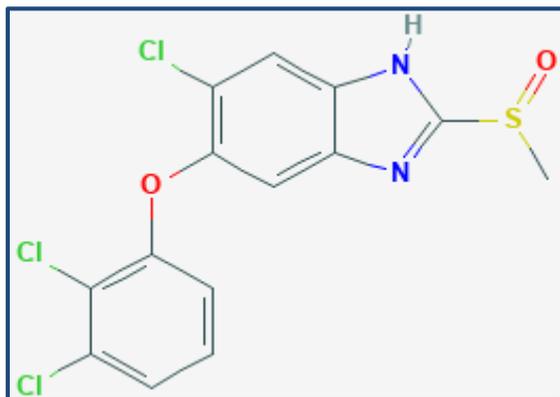


Figura 3. Estructura química del TCBZ-SO.

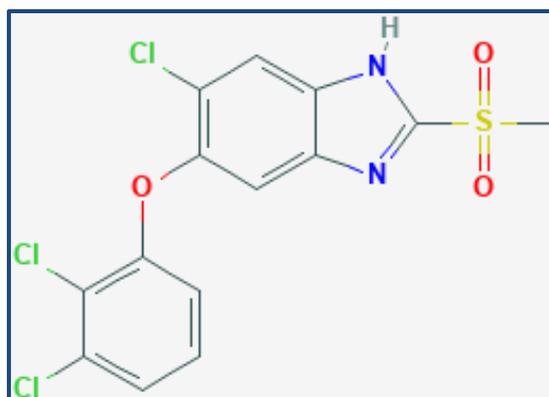


Figura 2. Estructura química del TCBZ-SO₂.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de interés de los metabolitos de TCBZ.

Propiedad	TCBZ-SO	TCBZ-SO ₂
Log P	4.77	2.95
Solubilidad acuosa	0.3638 mg/L (25 °C)	10.34 mg/L (25 °C)
pKa	1.35 / 9.25	6.18

Kinab y Bogan (1988) encontraron que no hay diferencia en los parámetros farmacocinéticos de TCBZ-SO y TCBZ-SO₂ si los animales presentan infección o no. Además, Gokbulut y cols. (2010) encontraron que en ayuno la absorción del fármaco es mayor, al obtener valores para $C_{m\acute{a}x}$ y ABC significativamente mayores en los animales sin comida que en los que recibieron alimento. Esto podría deberse a que el alimento retarde el vaciamiento gástrico, retrasando la absorción del fármaco. En ambos estudios se administraron a los animales con la suspensión oral 10% TCBZ a 12 mg/kg.

II.i.iv. Farmacodinamia

Se ha reportado que el TCBZ y sus metabolitos TCBZ-SO y TCBZ-SO₂ presentan actividad contra *F. hepatica in vitro* (Halferty y cols. 2009). TCBZ presenta actividad contra el parásito en estadios adultos y jóvenes, incluso huevecillos, siendo un comportamiento inusual, ya que a su vez presenta selectividad a *Fasciola spp.* y no presenta actividad contra otros nematodos y cestodos (Fairweather y Boray, 1999).

Su mecanismo de acción, al igual que otros bencimidazoles, se basa en la disrupción de tubulina (unión selectiva en β -tubulina), por lo que afecta todos los procesos celulares que impliquen la intervención de microtúbulos. El mecanismo más estudiado es el del TCBZ-SO, encontrando que actúa sobre los procesos secretorios dependientes de microtúbulos en las fasciolas (Fairweather y Boray, 1999). En el tegumento de estas, TCBZ-SO mostró bloqueo en el transporte de cuerpos secretorios desde células corpusculares a la superficie del tegumento, causando grave daño superficial y hasta la desintegración de este. También se sabe que TCBZ-SO inhibe la división mitótica de células espermatogénicas del parásito (Fairweather, 2005).

III. JUSTIFICACIÓN

La fasciolosis es una infección parasitaria a nivel mundial causada por trematodos del género *Fasciola*, siendo el más importante *F. hepatica*. Es un padecimiento zoonótico que afecta principalmente a vacas, ovejas y búfalos, aunque también existen casos en cabras, caballos, cerdos y otras especies herbívoras, así como el humano (Dalton, 1999). Esta infección es de importancia económica y de salud pública, ya que es causa de fuertes pérdidas, tanto en producción como en ganancia, en el ámbito ganadero, y es por ello que se ha realizado una cantidad significativa de investigación para atacar el padecimiento (Mehmood y cols., 2017; Moazeni y Ahmadi, 2016).

En América Latina hay fuerte prevalencia de la fasciolosis tanto en humanos como en rumiantes. Del año 2000 a 2015 se tienen registrados 10 estudios de los cuales se sabe que hay una prevalencia del 8.87-100% en ovejas, 24.5-100% en cabras, 3.0-66.7% en becerros y 11.4-24.4% en búfalos (Mehmood y cols., 2017), siendo México, Brasil, Argentina, Perú y Colombia los países más afectados.

Actualmente se han buscado alternativas para el tratamiento de la fasciolosis, entre las cuales incluyen modificaciones estructurales a la molécula del TCBZ (Flores-Ramos y cols., 2014) o la síntesis de derivados hidrosolubles del mismo mediante una técnica de profármaco (Flores-Ramos y cols., 2017; Ibarra-Velarde y cols., 2018). En un estudio piloto en borregos se encontró que el profármaco de tipo fosfato di sódico de triclabendazol, administrado vía intramuscular, fue eficaz a una dosis de 6 mg/Kg al encontrar reducción total de los huevos larvarios, así como del número total de fasciolas.

Como parte del avance en la investigación del profármaco hidrosoluble del TCBZ, es necesario estudiar su desempeño *in vivo*, no sólo midiendo eficacia sino también evaluando las diferencias en la absorción entre éste y el tratamiento utilizado comúnmente en la práctica veterinaria (suspensión oral 10% TCBZ).

Dado esto, surge la necesidad de contar con un método analítico confiable para la cuantificación de TCBZ y sus metabolitos principales (TCBZ-SO y TCBZ-SO₂) en plasma ovino en concentraciones de 0.5 a 20 µg/mL, por lo que se decidió desarrollar un método por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) en fase reversa con detección al UV, buscando la columna que brindara la adecuada separación de los metabolitos del TCBZ (sulfóxido y sulfona), al igual que la composición de la fase móvil que permitiera la elución de los analitos en un tiempo razonable.

IV. HIPÓTEISIS

El método analítico desarrollado permitirá, a diferencia de otros métodos reportados, cuantificar de manera simultánea al triclabendazol y a sus principales metabolitos, mediante cromatografía de líquidos en fase reversa con detección UV, en muestras de plasma ovino.

V. OBJETIVOS

V.i. Objetivo general

Desarrollar un método analítico para la cuantificación de triclabendazol y sus principales metabolitos en plasma ovino en un intervalo de concentración de 0.5 a 20 $\mu\text{g/mL}$ para cada analito.

V.ii. Objetivos particulares

- Seleccionar las condiciones cromatográficas para la separación y cuantificación de los analitos.
- Establecer las condiciones para la extracción del triclabendazol y sus principales metabolitos de muestras de plasma ovino.
- Llevar a cabo pruebas de *pre* validación de la metodología para asegurar la confiabilidad de las condiciones generadas mediante la evaluación de la selectividad del método, la linealidad, la precisión y la exactitud de los datos.

VI. DESARROLLO EXPERIMENTAL

VI.i. Preparación de soluciones

- Soluciones de Estándar Interno (EI).

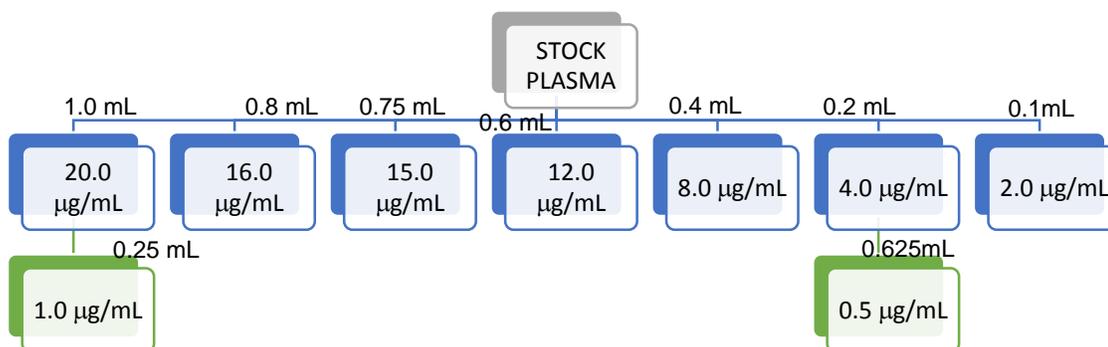
Se prepararon soluciones de ABZ y MBZ a una concentración de 50.0 $\mu\text{g/mL}$ disolviendo 10.0 mg de cada uno con 0.5 mL de DMSO (ABZ) o ácido fórmico (MBZ), llevando a 10.0 mL con metanol. De esta solución se tomó una alícuota de 0.5 mL y se diluyó a 10.0 mL con metanol.

Para CBZ se preparó una solución de concentración 25.0 $\mu\text{g/mL}$ disolviendo 5.0 mg de estándar en 10.0 mL de metanol, tomando una alícuota de esta de 0.5 mL y diluyéndola a 10.0 mL con metanol.

- Soluciones de TCBZ, TCBZ-SO y TCBZ-SO₂.

Se preparó una solución en metanol conteniendo los tres analitos a una concentración de 2000 $\mu\text{g/mL}$ cada uno, pesando 20.0 mg de cada uno, disolviéndolos con 2.0 mL de DMSO y llevando a 10.0 mL con metanol.

A partir de esta se preparó un stock en plasma ovino a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ tomando una alícuota de 0.5 mL y llevándola a 10.0 mL con plasma, del cual, se prepararon los puntos de la curva de calibración, según se describe en el esquema 1.



Esquema 1. Preparación de las muestras.

VI.ii. Metodología experimental

Inicialmente, la metodología se desarrolló para la cuantificación de los metabolitos de TCBZ y posteriormente se decidió incluir al fármaco de modo tal que se pudieran cuantificar los tres analitos en una misma corrida analítica y bajo las condiciones de extracción previamente establecidas. La razón de incluir al fármaco fue que en la formulación a evaluar es una formulación inyectable del profármaco de TCBZ, y dado que se desconoce el proceso metabólico al administrarlo por vía intramuscular, es probable que se pueda cuantificar TCBZ inalterado en plasma.

En los estudios de farmacocinética previamente publicados (Hennessy y cols., 1987; Mestorino y cols., 2008), los valores de $C_{m\acute{a}x}$ para TCBZ-SO y TCBZ-SO₂ tras una administración de 12mg/kg vía oral fueron de alrededor de 13 $\mu\text{g/mL}$ para ambos, los cuales se alcanzan alrededor de las 30 y 40 h respectivamente. Así, el intervalo de trabajo se acotó de 0.5 a 20.0 $\mu\text{g/mL}$, representando del 4 al 154% del valor de $C_{m\acute{a}x}$.

VI.ii.i. Condiciones cromatográficas.

- Selección de longitud de onda.

Se prepararon soluciones individuales de cada analito a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ en cada una de las fases móviles evaluadas (tabla 2) y se hizo un barrido al UV (190-400 nm) de cada analito para determinar la longitud onda de máxima absorción.

- Columna cromatográfica.

Para la separación de los analitos se probaron dos columnas cromatográficas: La primera columna fue una ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈ (Agilent Technologies) 150 x 4.6 mm (d.i), 5 μm tamaño de partícula, 80 Å tamaño de poro, 10% carbono, doble endcapping y área superficial de 180 m²/g.

La segunda columna utilizada fue una Spherisorb ODS1 (Waters) 250 x 4.6 mm (d.i), 5 μm tamaño de partícula, 80 Å tamaño de poro, 6.2% carbono, sin endcapping y área superficial de 220 m²/g.

- Selección de la fase móvil (FM).

Se evaluaron diferentes mezclas de disolventes variando la composición y proporción de estos hasta obtener aquella con la cual los analitos se pudieran cuantificar con una adecuada resolución y buena forma de pico, sin que se presentasen interferencias por señales propias de blancos de plasma.

La tabla 2 muestra la composición y proporción de cada disolvente de las diferentes FM evaluadas y la columna en la que fueron probadas.

Tabla 2. FM evaluadas para separación de analitos.

Composición	Proporción	Columna
MeOH:AcONH ₄	75:25	Zorbax
MeOH:AcONH ₄	70:30	Zorbax
ACN:AcONH ₄	65:35	Zorbax
ACN:AcONH ₄	50:50	Zorbax Spherisorb
ACN:MeOH:AcONH ₄	40:10:50	Spherisorb
ACN:MeOH:AcONH ₄	50:10:40	Spherisorb
ACN:AcONH ₄	80:20	Spherisorb

- Velocidad de flujo.

Para garantizar una buena separación, pero a la vez un tiempo de corrida corto, se evaluaron flujos de 0.8, 1.0, 1.2 y 1.5 mL/min.

- Estándar interno (EI).

Se realizaron pruebas con albendazol (ABZ), mebendazol (MBZ) y carbamazepina (CBZ) como estándar interno tanto en solución como al evaluar las condiciones de extracción.

VI.ii.ii. Condiciones de extracción.

Se decidió utilizar una extracción en fase sólida empleando cartuchos SepPak Vac 3cc (Waters) 500 mg. La metodología de extracción de los analitos se desarrolló evaluando el % de recobro absoluto (Snyder y cols., 2010) y la variación de las respuestas de las muestras blanco (sin ningún componente añadido), cero (cargado con EI), límite inferior de cuantificación (0.5 µg/mL de cada analito + EI) y límite superior de cuantificación (20.0 µg/mL de cada analito + EI) de la curva de calibración.

En la tabla 3 se resumen las condiciones evaluadas empleando el método de extracción sólido-líquido. En todos los casos los cartuchos se acondicionaron con 5.0 mL de MeOH_{HPLC} y después 5.0 mL H₂O_{HPLC} antes de cargar las muestras. Los lavados de las muestras en el cartucho se hicieron con 4x2.5 mL de AcONH₄ 0.025 M, la elución fue con 3.0 mL de disolvente y una vez evaporado éste, los residuos se reconstituyeron en 200 µL del disolvente indicado, inyectando 50 µL al cromatógrafo.

Tabla 3. Condiciones probadas para la extracción en fase sólida.

Condición	Condiciones evaluadas				
	Precipitación de proteínas	Dilución de sobrenadante	Lavado de muestra en el cartucho	Elución de muestra del cartucho	Reconstitución
1	Sí	No	H ₂ O	MeOH	ACN:MeOH:AcONH ₄ (50:10:40)
2	Sí	H ₂ O	H ₂ O	MeOH	ACN:MeOH:AcONH ₄ (50:10:40)
3	Sí	H ₂ O	H ₂ O	ACN	ACN:MeOH:AcONH ₄ (50:10:40)
4	Sí	No	H ₂ O	ACN	ACN:MeOH:AcONH ₄ (50:10:40)
5	Sí	H ₂ O	H ₂ O	ACN	MeOH _{HPLC} 100%
6	No	No Aplica	H ₂ O	ACN	MeOH _{HPLC} 100%
7	Sí	H ₂ O	H ₂ O	MeOH 2% AcOH	ACN:AcONH ₄ (80:20)
8	Sí	AcONH ₄	H ₂ O	MeOH 2% AcOH	ACN:AcONH ₄ (80:20)
9	Sí	AcONH ₄	AcONH ₄	MeOH 2% AcOH	ACN:AcONH ₄ (80:20) (85:15)
10	Sí	AcONH ₄	AcONH ₄	MeOH 2% AcOH	ACN:MeOH:AcONH ₄ (50:10:40)

VI.iii. Confiabilidad del método

- *Selectividad.*

Con el fin de demostrar que no existe interferencia de compuestos endógenos de la matriz biológica en la cuantificación de los analitos, se procesaron las muestras de plasma de 4 animales, más dos muestras de la mezcla de estas, así como otras muestras de suero hemolizado y plasma hemolizado, empleando la metodología 9 de la tabla 3. No se probó la muestra lipémica debido a que los animales permanecerán en ayuno las primeras horas del estudio y posteriormente la dieta será controlada, por lo que no se espera que se presente dicho fenómeno.

Si el cociente de la respuesta observada en los blancos de plasma cercana a los t_R de los analitos respecto a la respuesta del LIC no es mayor que el 20%, ni mayor que el 5% de la respuesta obtenida para el EI, entonces el método es selectivo.

▪ *Reutilización de cartuchos.*

Con las condiciones de extracción “9” de la tabla 3 se determinó cuántas veces era posible reutilizar un cartucho. Para ello se prepararon las muestras de una curva de calibración y se extrajeron empleando un cartucho por muestra. Posteriormente estos cartuchos fueron utilizados en 5 ocasiones extrayendo muestras conteniendo una concentración de 15 $\mu\text{g/mL}$, por lo cual el cartucho se utilizó 6 veces. Al terminar cada extracción, los cartuchos se lavaron con 2x3.0 mL de MeOH:H₂O (50:50) y se dejaron secar a vacío por 1 min.

La respuesta obtenida de cada analito en cada extracción, se interpoló en la curva de calibración y para cada muestra se determinó el % desviación respecto a la concentración nominal. Se aceptaron las réplicas cuyos % desviación fueron menores al 15%.

▪ *Curva de calibración*

Para la evaluación de este parámetro se prepararon en un mismo día y por triplicado, curvas de calibración a las concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 12.0, 16.0 y 20.0 $\mu\text{g/mL}$ de cada uno de los tres analitos. Se calculó el cociente “área de analito/área de EI” (como respuesta) y se evaluaron diferentes modelos matemáticos para describir de manera lineal la relación concentración-respuesta (lineal, $1/x$, $1/x^2$ y log-log). El mejor modelo se seleccionó tomando los siguientes criterios: una menor suma de cuadrados, un mayor ajuste a la probabilidad normal, una menor dispersión de residuales, un coeficiente de correlación de mayor a 0.99 y el % desviación de la concentración recuperada en cada nivel de concentración es menor o igual al 15% (20% para LIC) respecto a la concentración nominal.

▪ *Precisión.*

Para este parámetro se evaluó *repetibilidad* y *reproducibilidad (Precisión Intermedia)* de los datos. Para la repetibilidad se calculó el CV% del promedio de la concentración recuperada de cada nivel de 3 curvas de calibración de un mismo día. Para reproducibilidad, se calculó el CV% de cada nivel de concentración de 6 curvas

de calibración preparadas en diferentes días. Para ambas pruebas, el valor de CV% del promedio de la concentración recuperada debió ser menor o igual al 15% para demostrar cumplimiento.

- *Exactitud.*

Con los datos de precisión, de cada muestra se determinó el % desviación mediante la siguiente ecuación.

$$\% \text{ desviación} = \left| \frac{\text{Concentración nominal} - \text{Concentración recuperada}}{\text{Concentración nominal}} \right| * 100$$

Para que el método se considere exacto, el valor del promedio del % desviación de cada nivel de concentración debe ser menor o igual a 15%.

VI.iv. Aplicación del Método para la Cuantificación de los analitos en Plasma Humano.

Una vez desarrollado el método, se evaluó la viabilidad de cambiar de matriz biológica, empleando para ello, plasma humano. Se prepararon 3 curvas de calibración en el mismo rango de concentraciones previamente utilizado (0.5 – 20 µg/mL) para los 3 analitos y se determinó la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación de una recta de ajuste lineal, así como el % desviación de cada nivel de concentración. Los valores se compararon con los obtenidos en plasma ovino.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VII.i. Condiciones cromatográficas.

- Selección de longitud de onda.

En la figura 4 se muestran los espectros correspondientes a cada analito a una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ en ACN:MeOH:AcONH₄ (50:10:40). Dado que hay un pico de absorción máxima para los tres analitos entre 298 y 303 nm, se eligió 300 nm como longitud de onda de trabajo.

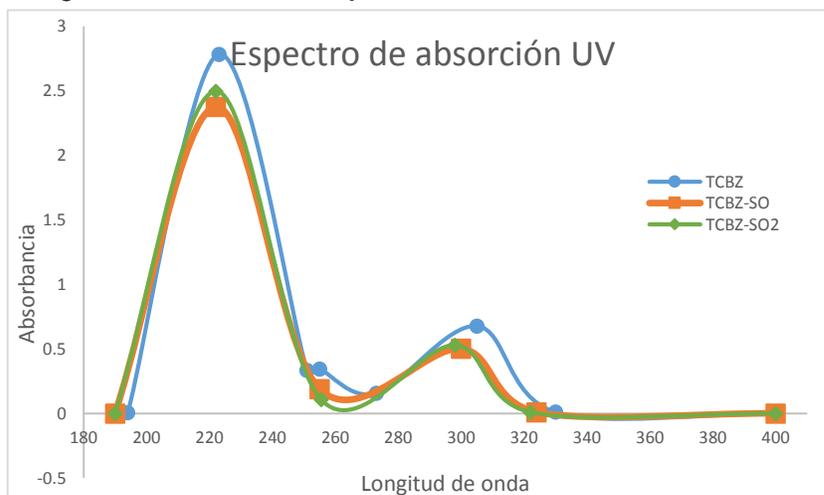


Figura 4. Espectros de absorción UV de los analitos.

- Columna cromatográfica.

Las figuras 5 y 6 muestran cromatogramas obtenidos al inyectar 50 μL de una solución con los analitos a 50 $\mu\text{g/mL}$, empleando las dos columnas, utilizando como FM ACN:AcONH₄ (50:50) a 1.5 mL/min. Se puede observar que la columna Spherisorb ODS1 fue la que presentó una mejor separación de los analitos (Resolución de 1.293 y 2.859 con la columna Zorbax; Resolución de 12.180 y 6.669 con la columna Spherisorb). Ello se debe a que su longitud y área superficial (25 cm, 220 m²/g) son mayores que la Zorbax Eclipse XDB (15 cm, 180 m²/g).

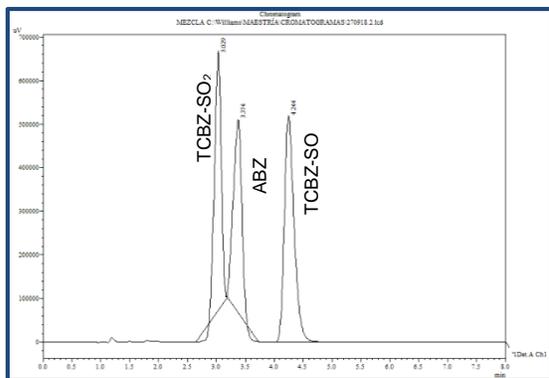


Figura 6. Separación con columna Zorbax.

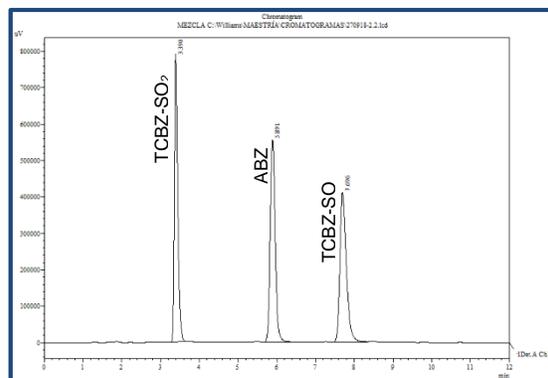


Figura 5. Separación con columna Spherisorb.

▪ Composición de fase móvil (FM).

Los resultados mostraron que las fases móviles que no contenían MeOH presentaban baja resolución de los picos y cuando el contenido de fase orgánica era muy alto los tiempos de retención se encontraban a menos de 5 min, lo que podría dar lugar a que los componentes del plasma interfirieran en el análisis.

La FM con la que se obtuvo mejor separación fue la compuesta por ACN:MeOH:AcONH₄ en proporción 50:10:40.

▪ Velocidad de flujo.

Se seleccionó la velocidad de flujo de 1.5 mL/min ya que el análisis es relativamente corto y los analitos se encuentran bien resueltos ($R= 2.267$ TCBZ-SO₂/CBZ, 8.330 CBZ/TCBZO-SO y 9.253 TCBZ-SO/TCBZ).

▪ Estándar interno (EI).

Al evaluar las condiciones de extracción fue necesario cambiar el estándar interno. Se comenzó a trabajar con ABZ (t_R 4.100 min), sin embargo se observó que se presentaba un pico interferente al final del pico de TCBZ-SO₂ (t_R 2.520 min) el cual pudiera ser sulfóxido de ABZ (t_R 2.560 min), ya que en las muestras blanco adicionadas de ABZ presentaron dicho pico. Al probar MBZ (t_R 2.760 min) se encontró que su t_R era semejante al de TCBZ-SO₂, interfiriendo con la cuantificación. Al emplear CBZ (t_R 3.530 min) se encontró que tanto en solución como en las muestras de plasma (figura 7) el perfil cromatográfico era adecuado, por lo que se decidió utilizarla como EI.

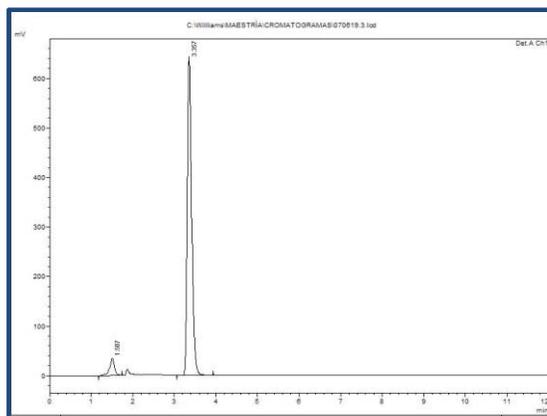


Figura 7. Cromatograma de una muestra blanco de plasma adicionada con CBZ.

La tabla 4 resume las condiciones analíticas finales seleccionadas para llevar a cabo la cuantificación de los diferentes analitos en las muestras de plasma.

Tabla 4. Condiciones analíticas para el análisis de muestras con TCBZ.

Parámetro	Condición
Columna cromatográfica	Spherisorb ODS1 250 x 4.6 mm, 5 μ m
Pre columna	Ninguna
Fase Móvil	ACN:MeOH:AcONH ₄ (0.025 M pH 7.00) (50:10:40)
Velocidad de flujo (mL/min)	1.5
Volumen de inyección (μ L)	50
Longitud de onda (nm)	300
Tiempo final de corrida (min)	12.0
Temperatura de análisis	Ambiente

VII.ii. Condiciones de extracción.

Al hacer la revisión de la literatura, se encontró que la mayoría de los métodos empleados para cuantificar los metabolitos de TCBZ emplean extracción en fase sólida. (Bull y Shume, 1987; Gokbulut y cols., 2010; Hennessy y cols., 1987; Lifschitz y cols., 2009; Mestorino y cols., 2008; Negro y cols., 1992). Este tipo de extracción es ampliamente utilizada ya que al permitir la retención selectiva de los analitos de interés, se disminuyen las interferencias de la matriz (Snyder y cols., 2010). Así mismo los resultados son más reproducibles.

En la tabla 5 se muestran los resultados de recobro obtenidos bajo las diferentes condiciones de extracción evaluadas según se indica en la tabla 3.

De los resultados obtenidos se pudo observar que el pH tiene fuerte impacto en el recobro de los analitos, al utilizar agua desionizada como diluyente, hay alta variabilidad en la cantidad recuperada de cada uno; mientras que al utilizar la solución amortiguadora de acetato se obtiene una mayor reproducibilidad en el recobro. Ello podría estar relacionado a que en pH menor a 7, los analitos estarían más ionizados. lo que impactara en la retención de los mismos en la fase estacionaria del cartucho. La condición seleccionada fue la 9, ya que fue aquella en la que se obtuvo el mejor recobro de los analitos (mayor a 88%) y la menor variabilidad.

Tabla 5. Recobro y determinación del método para SPE.

Condición	Recobro*				Observaciones
	TCBZ-SO ₂	TCBZ-SO	TCBZ	EI**	
1	59.8 (1.5)	35.7 (1.8)	-	56.5 (2.8)	Se observan recobros bajos.
	49.6 (5.0)	50.7 (4.7)			
2	58.4 (6.1)	41.7 (5.0)	-	58.7 (7.6)	No se observó mejora aparente en los resultados en cuanto a recobro respecto al método 1.
	49.7 (6.2)	53.3 (5.4)			
3	63.9 (0.9)	55.3 (1.1)	-	70.0 (12.3)	Se aumentó el recobro, sin embargo la variabilidad entre réplicas fue mayor.
	53.2 (12.8)	63.8 (14.9)			
4	90.1 (47.1)	61.2 (29.3)	-	70.4 (3.0)	El % recuperado aumentó pero la variabilidad para LIC de ambos analitos es muy alta.
	70.0 (4.0)	77.1 (4.3)			
5	Al reconstituir con MeOH se observaron picos deformes así como otros picos.				
6	Los resultados fueron similares a los obtenidos con la condición 5.				
7	76.4 (3.6)	73.7 (5.5)	-	92.4 (2.9)	Los blancos presentaron respuesta en los t _R de los analitos, lo cual dio lugar a un recobro > 100% para el LSC de TCBZ-SO ₂ .
	80.5 (3.5)	169.5 (4.5)			
8	76.3 (7.1)	74.5 (12.1)	-	87.1 (0.8)	Los resultados observados fueron similares a los obtenidos con la condición 7.
	84.8 (1.0)	180.4 (0.6)			
9	81.6 (7.4)	85.9 (6.2)	87.0 (1.7)	89.2 (1.5)	Buenos recobros, baja dispersión de los datos. Se considera el método adecuado para el análisis de las muestras.
	93.2 (9.5)	88.7 (3.8)	93.3 (2.8)		
10	54.4 (2.8)	76.5 (9.1)	77.0 (1.7)	80.5 (4.6)	Recobro menor que en la condición 9.
	56.5 (8.3)	76.6 (11.1)	69.6 (4.7)		

*: De cada caso, el renglón superior corresponde a una concentración de 0.5 µg/mL y el inferior a la de 20.0 µg/mL y se reportan como " \bar{X} (DE)" del porcentaje (%) recuperado respecto a la respuesta obtenida por soluciones de los analitos;

** : Pruebas 9 y 10 refieren al valor de CBZ, el resto al de ABZ.

Con base en lo anterior, las condiciones seleccionadas para la extracción de las muestras fueron las siguientes:

Preparación de la muestra

- 1) 1000 µL plasma cargado + 200 µL CBZ 25 µg/mL → vórtex 15 s.
- 2) Añadir 1000 µL Acetona → vórtex 15 s.
- 3) Centrifugar 5 min a 3500 rpm.
- 4) Recuperar sobrenadante y diluirlo con 5.0 mL de AcONH₄

Procedimiento de extracción

- 5) Acondicionar cartuchos (SepPak Vac 3cc) con 5.0 mL MeOH_{HPLC} seguido de 5.0 mL H₂O_{HPLC}.
- 6) Cargar *muestra*.
- 7) Lavar cartucho con 4x2.5 mL de AcONH₄.
- 8) Secar cartuchos al vacío por 10 min.
- 9) Eluir muestras con 3 mL de MeOH_{HPLC} 2 % AcOH.
- 10) Evaporar disolvente a 45 °C en atmosfera de N₂ por 30 min.
- 11) Reconstituir muestras secas en 200 µL de ACN:AcONH₄ (85:15).
- 12) Inyectar 50 µL al cromatógrafo, empleando las condiciones de análisis indicadas en la tabla 4.

En las figuras 8 y 9 se muestran los cromatogramas correspondientes a una muestra LIC y una muestra del límite superior de la curva de calibración, procesadas con las condiciones finales establecidas. Los tiempos de retención (t_R) de los analitos fueron 2.52 min (TCBZ-SO₂); 3.45 min (CBZ); 5.88 min (TCBZ-SO) y 9.59 min (TCBZ). En las figuras se puede observar que los componentes del plasma no interfieren con la cuantificación de ningún analito, principalmente con TCBZ-SO₂ al ser este el de menor t_R . En el estudio, el tiempo de corrida es de 12 minutos, permitiendo una separación adecuada de los 3 analitos y el estándar interno. Otros métodos reportados requieren de un tiempo de corrida 20 minutos.

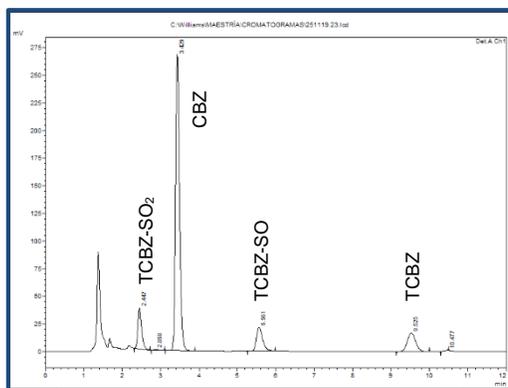


Figura 9. Cromatograma de muestra LIC.

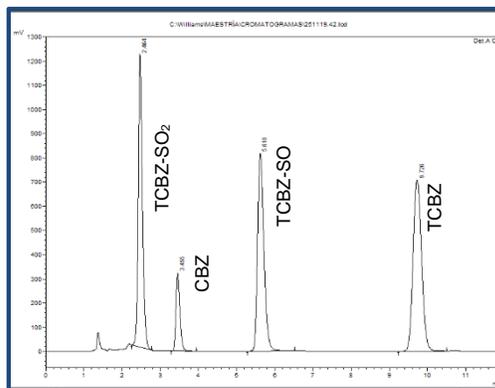


Figura 8. Cromatograma de muestra LSC.

VII.iii. Confiabilidad del método

- *Selectividad.*

Las figuras 10 y 11 muestran los cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra blanco de pool de plasma ovino y una muestra de plasma adicionada con los analitos en el LIC respectivamente, en el cual se observa que el método es selectivo. Se encontró que las señales observadas al inicio del cromatograma de la muestra blanco son altas, lo cual podría estar relacionado con la respuesta de los disolventes empleados para la extracción, por lo que sería conveniente que se utilizaran disolventes de muy alta pureza.

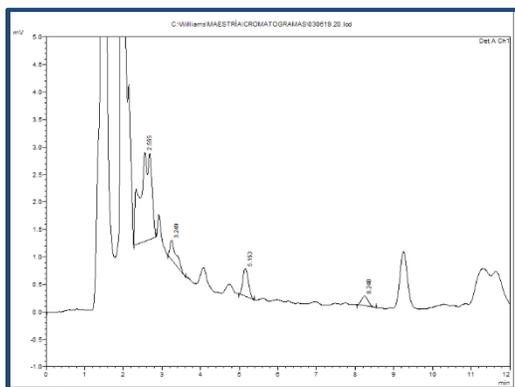


Figura 10. Cromatograma de una muestra blanco.

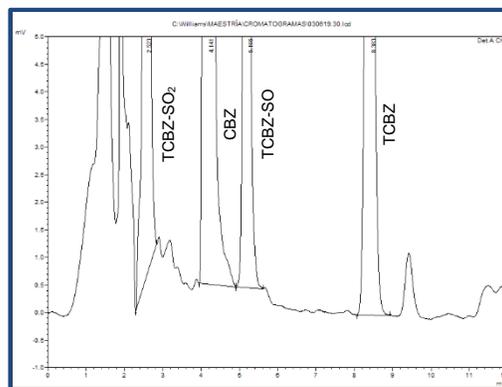


Figura 11. Cromatograma de una muestra LIC.

En la tabla 7 se presentan los % interferencia encontrados en cada muestra. Se puede observar que las respuestas analíticas de los blancos de plasma individuales o mezclados no fueron mayores a 20% respecto a las respuestas de la muestras LIC. Para la muestra de plasma hemolizado se observó una desviación mayor al 20% para TCBZ-SO₂, por lo cual se tendría que tener precaución en la toma de muestras, para evitar la hemólisis.

Tabla 6. Porcentaje de interferencia de respuesta de muestras blanco.

Muestra	TCBZ-SO ₂	CBZ	TCBZ-SO	TCBZ
Animal 1	12.00	0.21	4.07	1.98
Animal 2	13.79	0.17	2.31	0.97
Animal 3	12.02	0.18	1.97	0.38
Animal 4	10.41	0.18	1.17	0.62
Plasma Hemolizado	29.70	0.13	2.90	1.02
Suero hemolizado	16.50	0.11	3.17	0.17
Pool suero	11.23	0.19	1.17	0.00
Pool suero	16.34	0.19	9.47	1.86
Promedio	17.81	0.58	9.18	9.78
DE	9.66	1.21	17.88	26.73

- *Reutilización de cartuchos.*

Después de utilizar los cartuchos 6 veces consecutivas para el procesamiento de las muestras, se encontró que éstos podían ser utilizados hasta tres veces, antes de observar desviaciones de exactitud mayores al 15% (tabla 6). Únicamente se realizó la prueba a la concentración de 15 µg/mL, suponiendo que en caso de saturarse o retenerse los analitos, esto ocurriría con mayor probabilidad a altas concentraciones.

Tabla 7. Reutilización de cartuchos.

CURVA DE CALIBRACIÓN				
Regresión		TCBZ	TCBZ-SO	TCBZ-SO ₂
m		0.97478	0.95995	0.97728
b		-0.93303	-1.03233	-1.02672
r		0.99302	0.99927	0.99798
MUESTRAS CONTROL				
Concentración	Réplica*	% desviación**		
15 µg/mL	2	8.0	13.5	13.1
		2.9	14.0	19.0
		3.1	13.5	3.2
	3	6.0	13.7	-0.3
		-0.3	9.1	6.5
		0.1	10.1	10.5
	4	184.5	221.0	201.0
		196.7	224.8	209.7
		187.0	213.6	195.1

*. Previo a ese uso se procesó la CC. Sólo se muestra hasta el 4 uso porque los datos a partir de este son similares.

** En rojo se señalan los valores fuera del valor de aceptación.

▪ *Curva de calibración.*

La Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013 establece que para la curva de calibración en fluidos biológicos se debe definir el modelo matemático que describa adecuadamente la relación concentración y respuesta, la cual debe ser continua y reproducible en el intervalo de trabajo seleccionado, por lo que los datos se ajustaron a los siguientes modelos: lineal, $1/x$, $1/x^2$ y log-log.

La tabla 8 muestra la suma de cuadrados de los residuales de cada modelo evaluado. Se observa que el menor valor para TCBZ y para TCBZ-SO₂ se obtiene con el modelo $1/x^2$ y para TCBZ-SO con el modelo log-log. En las figuras 12 y 13 se presentan los gráficos de residuales de 3 curvas de calibración de TCBZ-SO₂ para los modelos $1/x^2$ y log-log, respectivamente, empleando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI.I. Se puede observar que a pesar de que la suma de cuadrados es menor para el modelo $1/x^2$, el ajuste de probabilidad normal (figuras 12-a, 13-a) es mayor con el modelo log-log, y también se obtuvo menor dispersión de los residuales para el mismo modelo (figuras 12-b, 13-c).

La tabla 9 presenta los parámetros de regresión de cada modelo, donde se puede ver que para TCBZ, los modelos de ponderación no cumplen con el valor del coeficiente de correlación, y que los valores más altos para este mismo parámetro

se encuentran con el modelo logarítmico para los tres analitos. Tomando en cuenta lo anterior, el modelo elegido para el análisis de los datos fue el logarítmico. La figura 14 muestra el gráfico de una curva de calibración de cada analito, ajustada al modelo logarítmico, en la cual se observa que existe un buen ajuste lineal para los tres analitos al utilizar el modelo log-log.

En la tabla 10 se presentan los valores de pendiente, ordenada y coeficiente de correlación de las 3 curvas de calibración, linealizadas con el modelo log-log, así como los valores de concentración recuperada por nivel y sus % desviación. Se observa que los coeficientes de correlación para todas las curvas fueron mayores a 0.99 y que los % desviación de cada nivel de concentración y para cada analito son menores a 15%, por lo que se cumplen los criterios de aceptación establecidos.

Tabla 8. Suma de cuadrados de los residuales para cada modelo.

Modelo	Analito		
	TCBZ	TCBZ-SO	TCBZ-SO ₂
Lineal	0.06566	0.07225	0.12408
1/x	0.00945	0.01015	0.01322
1/x ²	0.00271	0.00351	0.00278
log-log	0.00583	0.00239	0.00971

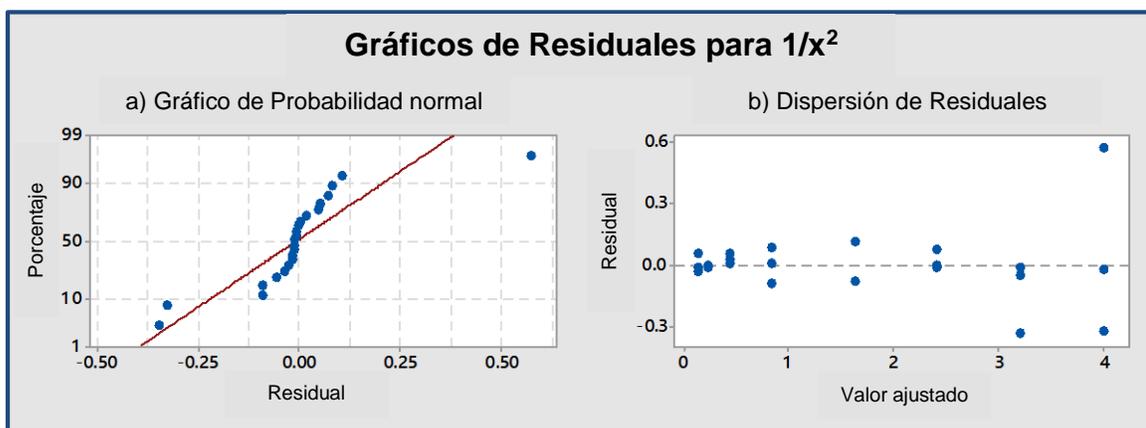


Figura 13. Gráficos de Residuales para el modelo 1/x².

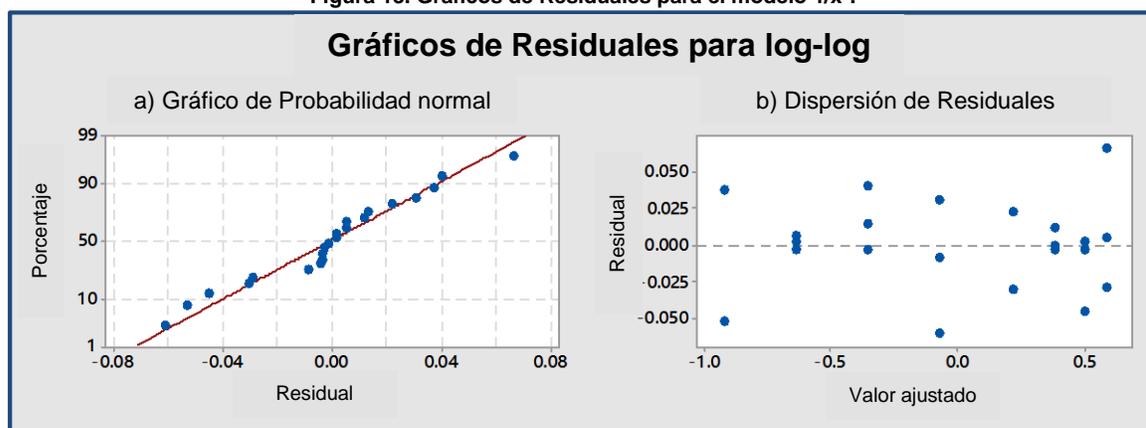


Figura 12. Gráficos de Residuales para el modelo logarítmico.

Tabla 9. Parámetros de linealidad para una curva de calibración con los diferentes modelos de ajuste.

Analito	Modelo	M	b	r
TCBZ	Lineal	0.22906	0.06478	0.99836
	1/x	0.20284	0.03571	0.91100
	1/x ²	0.19578	0.04959	0.88511
	log-log	0.95049	-0.57197	0.99863
TCBZ-SO	Lineal	0.19499	0.02534	0.99752
	1/x	0.19344	0.03759	0.99719
	1/x ²	0.19979	0.02511	0.99123
	log-log	0.94366	-0.64931	0.99942
TCBZ-SO ₂	Lineal	0.19183	0.05637	0.99561
	1/x	0.19568	0.02580	0.99639
	1/x ²	0.20359	0.01026	0.99316
	log-log	0.95979	-0.65871	0.99784

Tabla 10. Linealidad del método.

Analito	Regresión			Concentración Recuperada (µg/mL)			% desviación			Conc. Nom.
	m (IC)	b	r	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 1	Curva 2	Curva 3	
TCBZ	0.98182 (0.945-1.019) 0.95763 (0.937-0.979) 0.95049 (0.893-1.010)	-0.64332 -0.60305 -0.57197	0.99964 0.99982 0.99863	*	0.5147	0.5016	*	2.44	-0.19	0.5
				1.0274	0.9687	0.9401	2.23	-3.61	-6.46	1.0
				2.0869	1.9306	2.3041	3.83	-3.95	14.63	2.0
				3.9117	4.2865	3.7164	-2.69	6.63	-7.55	4.0
				7.3287	*	*	-8.85	*	*	8.0
				11.6518	12.2294	12.7506	-3.38	1.40	5.73	12.0
				15.6421	16.3466	15.4022	-2.72	1.66	-4.21	16.0
				22.7163	19.2812	20.0596	13.02	-4.07	-0.20	20.0
TCBZ-SO	0.95911 (0.894-1.024) 0.93222 (0.916-0.949) 0.94366 (0.907-0.981)	-0.66941 -0.62833 -0.64931	0.99880 0.99988 0.99942	*	0.5066	0.5188	*	1.82	4.29	0.5
				*	0.9840	0.9816	*	-1.10	-1.34	1.0
				2.1016	2.0073	*	5.61	0.87	*	2.0
				3.7697	3.8341	3.8052	-5.28	-3.67	-4.39	4.0
				7.6291	*	7.8210	-4.16	*	-1.75	8.0
				11.9476	12.1908	11.3651	0.06	2.10	-4.81	12.0
				15.9425	15.6476	15.8692	0.14	-1.71	-0.32	16.0
				20.7148	20.2654	21.7003	4.09	1.84	9.05	20.0
TCBZ-SO ₂	0.96481 (0.897-1.033) 0.92235 (0.893-0.952) 0.95979 (0.897-1.023)	-0.64778 -0.62004 -0.65871	0.99814 0.99960 0.99784	*	0.5071	0.4663	*	0.91	-7.21	0.5
				1.0384	0.9801	1.0401	3.33	-2.48	3.49	1.0
				1.9829	2.1015	2.2946	-1.35	4.55	14.16	2.0
				3.9401	3.8838	3.5625	-1.99	-3.39	-11.38	4.0
				7.7353	*	8.6229	-3.79	*	7.25	8.0
				12.0831	11.9770	12.5667	0.19	-0.69	4.20	12.0
				*	15.9436	14.5466	*	-0.85	-9.54	16.0
				20.8715	20.5340	20.4651	3.84	2.16	1.82	20.0

*: Se presentó una falla cromatográfica que impidió la cuantificación de la muestra.

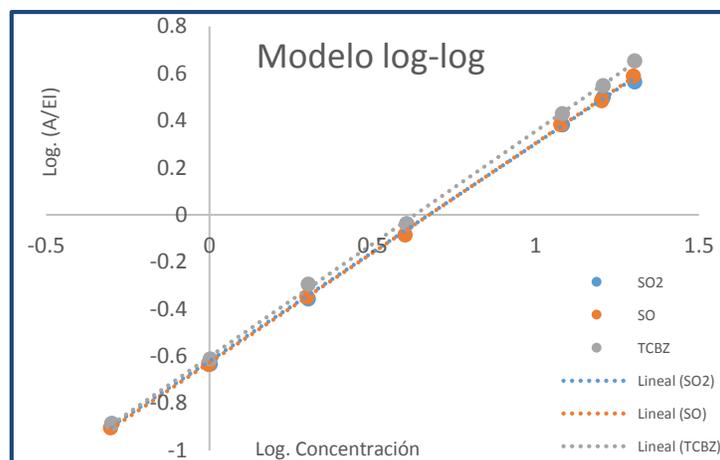


Figura 14. Gráfico de la CC con el modelo log-log

- *Precisión y Exactitud del Método.*

En la tabla 11 se muestran los promedios, desviación estándar y CV% obtenidos para las concentraciones recuperadas de la tabla 10, con lo cual se determina que el método es repetible ya que los CV% son menores a 15%. En la tabla 12 se muestran los promedios, desviación estándar y CV% obtenidos para las concentraciones recuperadas por nivel, de un total de 6 curvas de calibración, observándose que se cumple la reproducibilidad al ser los CV% menores de 15%. La tabla 13 contiene los valores promedio de porcentaje de desviación de las concentraciones recuperadas de un total de 6 curvas de calibración, mostrando que son menores a 15%, lo que indica que el método es exacto.

Tabla 11. Repetibilidad del método.

Nivel de concentración (µg/mL)	Promedio de concentración recuperada (µg/mL)			Desviación Estándar			CV%		
	TCBZ	TCBZ-SO	TCBZ-SO ₂	TCBZ	TCBZ-SO	TCBZ-SO ₂	TCBZ	TCBZ-SO	TCBZ-SO ₂
0.5	0.50433	0.51270	0.49051	0.00390	0.00867	0.03428	0.8	1.7	7.0
1.0	0.98621	0.98284	1.01208	0.04945	0.00170	0.03807	5.0	0.2	3.8
2.0	2.12948	2.05444	2.10402	0.16241	0.06668	0.18260	7.6	3.2	8.7
4.0	3.84677	3.80300	3.92022	0.11637	0.03223	0.36211	3.0	0.8	9.2
8.0	7.73532	7.72505	7.97577	0.00000	0.13568	0.91517	0.0	1.8	11.5
12.0	12.27021	11.83452	12.14929	0.41936	0.42430	0.46267	3.4	3.6	3.8
16.0	15.67294	15.81979	15.51177	0.38282	0.15356	0.90709	2.4	1.0	5.8
20.0	20.48834	20.89351	20.82087	0.40785	0.73397	1.74501	2.0	3.5	8.4

Tabla 12. Reproducibilidad del método.

Nivel de concentración (µg/mL)	Promedio de concentración recuperada (µg/mL)			Desviación Estándar			CV%		
	TCBZ	TCBZ-SO	TCBZ-SO ₂	TCBZ	TCBZ-SO	TCBZ-SO ₂	TCBZ	TCBZ-SO	TCBZ-SO ₂
0.5	0.48916	0.52838	0.49432	0.01778	0.03597	0.02656	3.6	6.8	5.4
1.0	1.01330	0.97658	1.00486	0.08854	0.07718	0.03427	8.7	7.9	3.4
2.0	2.17501	1.98928	2.13898	0.16086	0.09465	0.16468	7.4	4.8	7.7
4.0	3.92758	3.84347	4.00916	0.12767	0.06335	0.44292	3.3	1.6	11.0
8.0	7.69521	7.53273	7.77487	0.61222	0.88292	0.60047	8.0	11.7	7.7
12.0	12.34599	12.31869	12.14934	0.48938	0.83455	0.90452	4.0	6.8	7.4
16.0	15.78658	16.23408	15.79539	1.00523	0.59278	0.92749	6.4	3.7	5.9
20.0	20.43477	20.42922	20.72936	0.43142	1.33402	1.80200	2.1	6.5	8.7

Tabla 13. Exactitud del método.

Nivel de concentración	% desviación promedio		
	TCBZ	TCBZ-SO	TCBZ-SO ₂
0.5	3.1	6.0	4.6
1.0	7.4	4.8	3.0
2.0	8.7	3.3	6.6
4.0	2.9	3.4	8.6
8.0	5.6	8.6	7.0
12.0	3.4	5.0	5.9
16.0	4.8	2.6	4.6
20.0	2.1	5.8	7.1

Los resultados obtenidos muestran que, con la metodología desarrollada, se pueden cuantificar los 3 analitos en una misma corrida analítica con recobros aceptables y de manera reproducible. Además, al reducir el tiempo de análisis a 12 minutos, se reduce el tiempo de análisis, así como el uso de disolventes.

VII.iv. Aplicación del método en Plasma Humano.

Como se mencionó previamente, en 2019 la FDA al triclabendazol para su uso en humanos en el tratamiento de fasciolosis, por lo que se decidió evaluar la confiabilidad del método en esta matriz biológica.

La figura 15 muestra un cromatograma correspondiente a una muestra de plasma humano adicionado con los analitos a la concentración del LIC, donde se pueden identificar a cada uno en los mismos tiempos de retención que en plasma a ovino.

El intervalo de concentraciones fue el mismo que en plasma ovino debido a que la $C_{m\acute{a}x}$ reportada para TCBZ-SO en humanos tras la administración oral de 10 mg/kg de TCBZ con una dieta calórica es de alrededor de 14.5 µg/mL (DrugBank, 2019).

Al hacer la comparación de los valores de pendiente e intercepto de las curvas de calibración en ambos fluidos (tabla 14) se encontró que los resultados son similares. En la figura 16 se presenta el gráfico de regresión linealizado por el modelo log-log; esto indica que el método es adecuado para la cuantificación de los 3 analitos en ambas matrices.

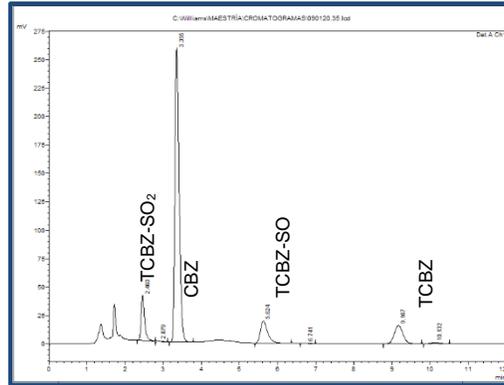


Figura 15. Cromatograma de una muestra de LIC en plasma humano.

Tabla 14. Comparación de regresión lineal entre plasma ovino y humano.

		REGRESIÓN			Intervalos de confianza (m)	
Analito	Matriz	m	B	r	Inferior	Superior
TCBZ	OVINO	0.95763	-0.60305	0.99982	0.9368	0.9785
	HUMANO	0.95192	-0.65008	0.99979	0.9297	0.9741
TCBZ-SO	OVINO	0.93222	-0.62833	0.99988	0.9156	0.9488
	HUMANO	0.92014	-0.69766	0.99892	0.8710	0.9693
TCBZ-SO ₂	OVINO	0.92235	-0.62004	0.99960	0.8925	0.9522
	HUMANO	0.93899	-0.68902	0.99955	0.9065	0.9715

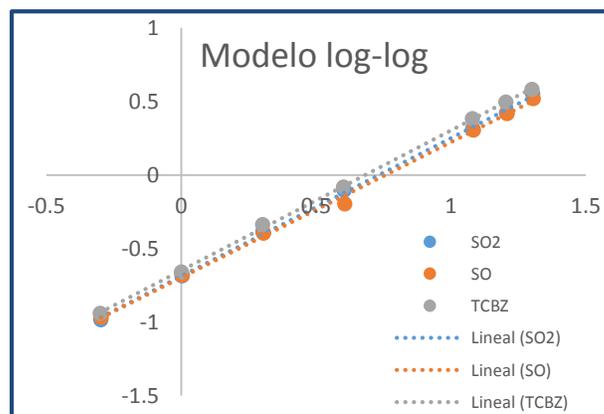


Figura 16. Gráfico de CC en plasma humano.

VIII. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método cromatográfico para la cuantificación de TCBZ y sus principales metabolitos en plasma ovino, encontrándose que
 - La columna más adecuada para llevar a cabo la separación es la *Spherisorb ODS1* (Waters®) dada su mayor longitud y área superficial que la columna Zorbax Eclipse XDB-C₁₈.
 - La fase móvil que permitió la mejor separación y cuantificación de las muestras fue ACN:MeOH:AcONH₄ (0.025 M, pH 7.00) en proporciones 50:10:40.
 - La velocidad de flujo que brindó el mejor análisis fue de 1.5 mL/min, con un volumen de inyección de 50 µL.
- El método de precipitación de proteínas seguido de la extracción sólido-líquido en cartuchos SepPak Vac 3cc C₁₈ (Waters®) demostró ser eficiente para la purificación de las muestras biológicas para recuperar los analitos.
- Los cartuchos SepPak Vac 3cc C₁₈ (Waters®) se pueden utilizar hasta 3 veces seguidas.
- El método analítico desarrollado es confiable, ya que demostró ser selectivo, lineal, repetible y reproducible para los tres analitos en el intervalo de concentraciones de 0.5 – 20.0 µg/mL.
- Es posible utilizar el método para la cuantificación de TCBZ y sus metabolitos en plasma humano.

IX. PERSPECTIVAS

- Evaluar la estabilidad de los analitos en muestras plasmáticas tanto a largo plazo como en ciclos de congelación-descongelación.
- Aplicar la metodología desarrollada en el estudio de Biodisponibilidad Relativa.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bull, M. S., y Shume, G. R. E. (1987). A rapid high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of triclabendazole and its metabolites in sheep plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 5(5), 527–531. [https://doi.org/10.1016/0731-7085\(87\)80063-8](https://doi.org/10.1016/0731-7085(87)80063-8)
- ChemSpider. (s.f.). Triclabendazole. Recuperado de <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.45565.html?rid=37b5b061-174b-4518-819d-655cc7f1feb5>
- Dalton, J. P. (1999). *Fasciolosis*. (J. P. Dalton, Ed.). Dublin, Irlanda: CABI Publishing.
- Dieter, A. (2012). Triclabendazole. Berlín: FAO. Recuperado de http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/12-2012-triclabendazole.pdf
- DrugBank. (2019). Triclabendazole. Recuperado de <https://www.drugbank.ca/drugs/DB12245>
- Fairweather, I., y Boray, J. C. (1999). Fasciolicides: Efficacy, actions, resistance and its management. *Veterinary Journal*, 158(2), 81–112. <https://doi.org/10.1053/tvj.1999.0377>
- Fairweather, I. (2005). Triclabendazole: new skills to unravel an old(ish) enigma. *Journal of Helminthology*, 79(3), 227–234. <https://doi.org/10.1079/JOH2005298>
- Flores-Ramos, M., Ibarra-Velarde, F., Hernández-Campos, A., Vera-Montenegro, Y., Jung-Cook, H., Cantó-Alarcón, G. J., ... Castillo, R. (2014). A highly water soluble benzimidazole derivative useful for the treatment of fasciolosis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 24(24), 5814–5817. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.10.017>
- Flores-Ramos, M., Ibarra-Velarde, F., Jung-Cook, H., Hernández-Campos, A., Vera-Montenegro, Y., y Castillo, R. (2017). Novel triclabendazole prodrug: A highly water soluble alternative for the treatment of fasciolosis. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 27(3), 616–619. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.12.004>
- Gokbulut, C., Boyacioglu, M., Karademir, U., y Aksit, D. (2010). The effect of fasting on the plasma disposition of triclabendazole following oral administration in goats. *Research in Veterinary Science*, 89(3), 415–417. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.04.009>
- Halferty, L., Brennan, G. P., Trudgett, A., Hoey, L., y Fairweather, I. (2009). Relative activity of triclabendazole metabolites against the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*, 159(2), 126–138. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.10.007>
- Hennessy, D. R., Lacey, E., Steel, J. W., y Prichard, R. K. (1987). The kinetics of triclabendazole disposition in sheep. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 10(1), 64–72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1987.tb00078.x>
- Ibarra-Velarde, F., Vera-Montenegro, Y., Flores-Ramos, M., Cantó-Alarcon, G. J., Hernández-Campos, A., Alcalá-Canto, Y., y Castillo, R. (2018). Assessment of the effective dose of an experimental intramuscular formulation against immature and adult *Fasciola hepatica* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 260(2017), 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2018.04.012>
- Kinab, L. D. B., y Bogan, T. L. J. A. (1988). Pharmacokinetics and efficacy of triclabendazole in

- goats with induced fascioliasis. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 11(3), 254–259. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1988.tb00150.x>
- Lifschitz, A., Virkel, G., Ballent, M., Sallovitz, J., y Lanusse, C. (2009). Combined use of ivermectin and triclabendazole in sheep: In vitro and in vivo characterisation of their pharmacological interaction. *Veterinary Journal*, 182(2), 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.06.001>
- Mehmood, K., Zhang, H., Sabir, A. J., Abbas, R. Z., Ijaz, M., Durrani, A. Z., ... Li, J. (2017). A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microbial Pathogenesis*, 109, 253–262. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.006>
- Mestorino, N., Formentini, E. A., Lucas, M. F., Fernandez, C., Modamio, P., Hernández, E. M., y Errecalde, J. O. (2008). Pharmacokinetic disposition of triclabendazole in cattle and sheep; discrimination of the order and the rate of the absorption process of its active metabolite triclabendazole sulfoxide. *Veterinary Research Communications*, 32(1), 21–33. <https://doi.org/10.1007/s11259-007-9000-3>
- Moazeni, M., y Ahmadi, A. (2016). Controversial aspects of the life cycle of *Fasciola hepatica*. *Experimental Parasitology*, 169, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.07.010>
- Negro, A., Alvarez-Bujidos, M. L., Ortiz, A. I., Cubría, J. C., Méndez, R., y Ordóñez, D. (1992). Reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatographic determination of triclabendazole metabolites in serum and urine. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 576(1), 135–141. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(92\)80184-R](https://doi.org/10.1016/0378-4347(92)80184-R)
- Royal Society of Chemistry. (s.f.). Chemspider.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., y Dolan, J. W. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley and Sons, Inc. (Third). New Jersey. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3029-0.50006-9>