

25/X/2010
No PDF

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO.

"METODOLOGIA PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD
ANTIHELMINTICA DE COMPUESTOS ORGANICOS".

TESIS

Que para obtener el grado de Maestro en Ciencias
Químicas.

(Farmacia Química Farmacéutica)

Presenta el Químico Farmacéutico Biólogo

CARLOS IGNACIO OTERO ICAZA

México, D.F.

1984.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO ORIGINALMENTE:

Presidente	Dr. Rafael Castillo B.
1er. Vocal	Dr. Enrique Pinzón
Secretario	M. en C. Angela Sotelo
Suplente	M. en C. Ma. Teresa Reguero
Suplente	M. en C. Juan Manuel Rodríguez

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

División de Estudios de Posgrado

Facultad de Química, U.N.A.M. y

Centro Nacional de Parasitología

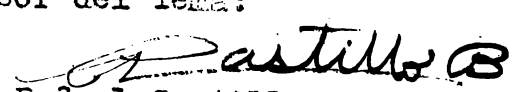
Animal. Subdirección de Referencia

D.G.S.A.

Sustentante:


Carlos Ignacio Otero Icaza

Asesor del Tema:


Dr. Rafael Castillo Bocanegra.

RESUMEN

En esta tesis se analizan y discuten los principales compuestos antihelmínticos. Se describe la síntesis del 3,5-difenilisoxazol y el efecto que tiene éste sobre Fasciola hepática. Por otro lado se establece una metodología para la determinación in vivo de la actividad antihelmíntica de compuestos orgánicos. El análisis de la bibliografía muestra algunos derivados del isoxazol como un grupo nuevo de compuestos con grandes posibilidades de actividad antihelmíntica. Estudios in vivo del 3,5-difenilisoxazol sobre Fasciola hepática en ratones albinos, no mostraron ningún efecto a dosis de 125 mg/Kg de peso.

Abstracts:

In this thesis are analyzed and discussed the main anthelmintics. The synthesis of 3,5-diphenylisoxazole is described and the effect that this compound has on Fasciola hepatica. On the other hand, a method to determine the in vivo anthelmintic activity of organic compounds is established. The literature analysis show some isoxazole derivatives as a new group of compounds with great potential as anthelmintics. In vivo studies of 3,5-diphenylisoxazole on Fasciola hepatica, in albino mice, did not show any activity at 30-125 mg per Kg doses.

INDICE .

I.- INTRODUCCION

II.- GENERALIDADES

III.- PARTE EXPERIMENTAL

IV.- RESULTADOS

V.- DISCUSION Y CONCLUSIONES

VI.- BIBLIOGRAFIA

VII.- APENDICE I (Espectros).

I.- INTRODUCCION.

Las enfermedades causadas por helmintos y su tratamiento, fueron descritos desde las escrituras Chinas y Egipcias, sin embargo ahora el tratamiento de algunas de ellas está muy lejos de ser satisfactorio, además las infecciones por helmintos presentan una prevalencia en el hombre y animales, sobre todo en regiones tropicales y subtropicales en cifras extremadamente alarmantes lo cual obligó a la Organización Mundial de la Salud a crear un programa especial sobre enfermedades tropicales, con el objeto de encontrar medidas prácticas de control, económicamente factibles para la mayoría de las enfermedades transmisibles, especialmente infecciones parasitarias, en los países en desarrollo. En México, la importancia que representan las helmintiasis ha significado la consideración dentro de las prioridades en la investigación biomédica, clínica y de salud pública. (1 y 2).

El objetivo del presente trabajo es encontrar posibles fármacos para el tratamiento de infecciones o enfermedades parasitarias y establecer la metodología experimental para determinar la actividad biológica antihelmíntica.

El estudio se inició con una revisión de todos los antihelmínticos preparados hasta la fecha, encontrándose al grupo de los isoxazoles con amplias posibilidades. Posteriormente, se intentó preparar algunos derivados del isoxazol y realizar la determinación de su actividad antihelmíntica por medio de bioensayos en animales de laboratorio. Con relación a las pruebas biológicas, estas se realizaron gracias a la cooperación del Centro Nacional de Parasitología Animal, en donde se nos brindó todo el apoyo para la consecución de los objetivos de esta investigación.

Estableciendo interrelación con el Departamento de Parasitología de dicha institución se planeó y elaboró la metodología para la determinación de la actividad antihelmíntica de compuestos orgánicos.

II.- GENERALIDADES

II.1.- Quimioterapia.

II.2.- Helmintos.

II.3.- Antihelmínticos.

II.4.- Justificación.

II.5.- Síntesis.

II.6.- Pruebas Biológicas.

II.- GENERALIDADES.

II.1.- Quimioterapia.

Es la rama de la terapéutica que estudia el tratamiento de enfermedades parasíticas (microbianas, virales, fúngicas, helmínticas, etc.) y neoplásicas por medio de agentes químicos (fármacos). El término debe ser reservado para el tratamiento que involucra la destrucción o supresión del parásito (microorganismos, virus, hongos, helmintos, etc.) o células neoplásicas sin producir un daño indebido al huésped. El tratamiento sintomático de la enfermedad, sin un efecto directo sobre el parásito o células neoplásicas, no debe ser incluido en un estudio de quimioterapia. (3)

Hasta el siglo pasado, el tratamiento de las enfermedades fue completamente empírico y una de las primeras sustancias químicas para el control de una enfermedad parasitaria fue el arsénico y algunos compuestos que contenían a este elemento, los cuales probaron tener efectos contra algunos parásitos.

Más tarde, Ehrlich examinó los efectos de una serie de colorantes, los cuales mostraban afinidad diferencial por los parásitos comparada con los tejidos del huésped, aunque estos trabajos no fueron enteramente satisfactorios desde el punto de vista práctico, si demostraron concluyentemente que es posible dañar a un parásito sin atacar al huésped. (4)

Lo anterior llevó a Ehrlich a describir el mecanismo de acción terapéutica como un "cerrojo - llave", lo que implicaba encontrar una sustancia química de cierta estructura molecular, la cual pudiera ser "aceptada" por el parásito, pero esto se ha modificado con nuevos descubrimientos como el de Findlay (1950), - que establece: "La concepción de que los agentes quimioterapéuticos compiten con los metabolitos de la célula por un sistema enzimático esencial para el metabolismo de la misma célula, es un lógico restablecimiento, en términos de química enzimática, del concepto original de Ehrlich de las células receptoras". (5)

II.1.1.- Evaluación de sustancias quimioterapéuticas.

a) Estimación de su actividad parasiticida.

Los compuestos son sometidos a un bioensayo que ha sido estandarizado, para un parásito en particular y un huésped específico.

b) Determinación de los mejores medios de administración.

La evaluación de un fármaco para su uso contra un parásito, puede ser particularmente difícil cuando el parásito tiene un ciclo de vida, el cual incluye varios estados de desarrollo.- Bajo condiciones experimentales en el laboratorio, es necesario determinar cual de las vías de administración hace más efectivo al fármaco.

5

c) Estimación de los efectos del fármaco sobre el huésped.

Un fármaco con un pequeño margen entre la dosis terapéutica y tóxica, no debe ser usado a menos que ningún sustituto pueda ser encontrado. En la práctica, una estimación real de la probable toxicidad no puede ser obtenida hasta que el fármaco ha sido probado bajo condiciones clínicas o de campo.

Existen factores de predisposición, los cuales pueden ser responsables de la aparición de la inesperada toxicidad.

Los fármacos pueden ser tóxicos para el hombre o los animales en algunos estados particulares de su desarrollo, jóvenes o viejos o solo cuando una dieta particular es dada.

II.1.2.- Términos especiales usados en Quimioterapia.

El índice terapéutico o índice quimioterapéutico (I.Q.) - de un fármaco es indicado por :

$$\text{I.Q.} = \frac{\text{dosis máxima tolerada}}{\text{dosis mínima curativa}}$$

Es obvio que la diferencia entre la dosis de un fármaco, la cual es letal para el parásito (dosis mínima curativa) y la mayor cantidad que es tolerada por el huésped (dosis máxima tolerada), debe ser suficientemente grande, para permitir su uso como medicamento, sin causar serios daños al paciente. El índice terapéutico es el seguro del fármaco en uso. Sin embar

go, debe recordarse que el índice puede variar considerablemente para el mismo parásito en diferentes especies de huésped o cuando es administrado por diferentes vías sobre el mismo huésped.- Comparaciones ~~de~~ de toxicidad pueden ser hechas sobre el punto de cincuenta por ciento (50%) de respuesta.

Una manera de expresar el índice terapéutico, es la proporción entre la dosis media letal (D.L. 50, la dosis que mata al 50% de los animales) y la dosis media efectiva (D.C. 50, la dosis que cura al 50% de los animales que sufren los efectos del parásito), ésto es :

$$I.Q. = \frac{D.L. 50}{D.C. 50}$$

Este no puede sin embargo, indicar directamente la dosis real curativa o la dosis real tóxica. Una mejor comparación, puede ser la dosis letal (D.L., la dosis que mata a todos los animales excepto al 0.1%) y la dosis efectiva (D.C. 99.9, la dosis que cura a todos los animales excepto al 0.1%).

$$I.Q. = \frac{D.L.}{D.C. 99.9}$$

II.1.3.- Bioequivalencia de fármacos.

La bioequivalencia de un compuesto es estimada como la dosis necesaria para producir la misma respuesta (usualmente la D.L. 50), como una unidad de dosis de algún otro compuesto de eficacia terapéutica conocida. Por ejemplo: la eficacia de una serie de coccidiostáticos puede ser estimada en términos de sul

II.1.4.- Sinergismo y Potenciación.

Sinergismo.- Indica que dos o más fármacos actúan juntos sobre el parásito.

El sinergismo incluye un tipo particular de co-actividad llamado Potenciación, la cual ocurre cuando el efecto del uso simultáneo de fármacos es mayor que el que podría esperarse cuando se usan por separado.

Esto puede llevarse a cabo de varias maneras, una por acción separada y secuencial de los fármacos, y otra debida a que uno de los fármacos ayuda a la penetración o absorción de otro.

II.1.5.- Resistencia a Fármacos.

La aparición entre parásitos, ordinariamente susceptibles a la acción de fármacos, de cepas resistentes, introduce uno de los más importantes problemas de la quimioterapia. Se sabe que las cepas resistentes a fármacos se deben al efecto selectivo del tratamiento en las poblaciones del parásito, las cuales consisten en mezclas de cepas que varían en su susceptibilidad al fármaco.

II.1.6.- Interferencia quimioterapéutica.

Este es un fenómeno, que como la resistencia está asociado con un decremento por parte del parásito a la capacidad de absorber el fármaco y es aparentemente iniciada por contacto previo con otros. Por ejemplo: La inyección de parafusina unas horas antes del tratamiento con tripaflavina o tartrato emético, interfiere con la acción de dichos fármacos.

II.2.- Helminthos.

Los helmintos que parasitan al hombre y a los animales son derivados a partir de dos phyla, Platelmintos y Nematelminthos.

El phylum Platelmintos contiene tres clases:

Turbellaria

Principalmente de vida libre y no son parasíticos del hombre y animales.

Tremátoda

Parasitan al hombre y a los animales.
Ejemplos:

P. Westermani
(pulmón)

C. sinensis
(pez)

F. buski
(intestino)

S. mansoni
(vesículas mesentéricas)

Cestoidea

Ejemplos:

D. lutum
(pez)

T. solium
(cerdo)

T. saginata
(res)

E. granulosus
(caballo)

H. nana
(humano)

El phylum Nematelminthos (verdaderos gusanos redondos), incluye muchas especies, algunas de ellas viven libremente y otras son parasíticas. Ejemplos:

A. duodenale

N. americanus

A. lumbricoides

T. trichiura

E. vermicularis

S. stercoraria

T. spiralis

Los gusanos parásitos son dependientes del hospedador para su existencia permanente. Ellos necesitan un mecanismo para tener acceso al cuerpo del huésped y sus brevecillos y la mayoría de ellos tienen un medio de escape a partir del cuerpo del huésped para perpetuar la especie; Los huevos de helmintos, en cambio, no son capaces de producir una infección inmediata en un nuevo huésped, un período de tiempo variable entre un huésped y otro.

ras en el caso de oxiuros, a meses en otros parásitos, es necesario antes de que el estado infectivo o infectante se alcance otra vez. (6)

II.2.1.- Platelminfos.

II.2.1.1.- Clases Turbellaria.

Los parásitos que pertenecen a esta clase no tienen importancia para nuestro estudio, ya que no son parásitos del hombre, y animales domésticos.

II.2.1.2.- Clase Tremátoda.

Los tremátodos tienen cuerpos no segmentados, con boca, un tracto alimenticio sin apertura anal y un sistema de excreción, cada gusano tiene una o más ventosas para fijación. Además tienen una capa cuticular externa que se encuentra total o parcialmente cubierta por espinas, tubérculos o redículos.

Los tremátodos pueden ser divididos en dos grupos: Los monogénicos (Monogenea) los cuales tienen un ciclo de vida directo en un huésped singular y parasitan al hombre.

Los digenéticos (Digenea) poseen complicados ciclos de vida y requieren uno a más huéspedes intermediarios para completar su ciclo de vida. Como el nombre lo implica, los digenéticos tienen dos generaciones; una sexual y otra asexual. La multiplicación tiene lugar en un huésped específico.

Los tremátodos digenéticos de importancia médica y veterinaria están enlistados en la tabla N° 1.

Las especies mencionadas son parásitos normales del hombre, excepto Fasciola hepática, siendo el hombre un huésped accidental para esta especie y no está involucrado en su ciclo de transmisión. (2, 6 y 7)

<u>Levinseni</u>	Vena mesentérica	Heces	moluscos
<u>S. japonicum</u>	Vena mesentérica	Heces	moluscos
<u>S. mansoni</u>	Venas vesiculares	Orina	moluscos
<u>Paragonimus westermani</u>	Pulmones	Espuito y heces	crustaceos
<u>Paratuberculosis hepatica</u>	Ductos biliares	Heces	moluscos (metacercarias) *
<u>Clonorchis (Opisthorchis) sinensis</u>	Ductos pancreáticos y biliares	Heces	peces
<u>Opisthorchis felinus</u>	Ductos pancreáticos y biliares	Heces	peces
<u>M. peiropsis bushi</u>	Intestino delgado	Heces	moluscos (metacercarias) *
<u>Heterophyes voluptyni</u>	Intestino delgado	Heces	moluscos y peces
<u>Heterophyes heterophyes</u>	Intestino delgado	Heces	moluscos y peces

* No son nítidamente específicos.

II.2.1.3.- Clase Céstoda.

Los céstodos son gusanos planos, los cuales varían en longitudes desde 1mm hasta 12mm. El gusano típico consiste de un "escolex" o cabeza (la que puede tener ventosas y algunas veces ganchos), unida por una corta junta al estrobilo, el cual consiste en una cadena de segmentos o proglotidos que son producidos por crecimiento y división de la junta.

En gusanos planos del orden Cyclorhynchida (incluye a todos los céstodos adultos que son parásitos en el hombre excepto Diphyllobothrium spp). Los proglotidos maduros a partir del "escolex", ya gravidos (llenos de huevos), son separados del estrobilo y son arrojados en las heces.

Todos los gusanos planos que infectan humanos son hermafroditas y la copulación puede tener lugar entre diferentes proglotidos del mismo estrobilo o entre proglotidos de diferentes estrobilos, si dos gusanos de la misma especie están presentes en el huésped.

Gusanos planos del orden Pseudophyllida (Ej: Diphyllobothrium latum gusanos de peces), poseen un poro uterino a través del cual descargan 1 millón de huevos por día.

El ciclo de vida típico de los céstodos, involucra uno o más huéspedes intermediarios y en el cual los huevos infectivos se desarrollan para convertirse en: procercos, plerocercos, cisticercos o larva de cisticercus. El huésped definitivo es infectado por consumo de tejidos de un huésped intermediario; en caso de infección hidatídica o cisticercosis, el hombre se ha visto en el papel de un huésped intermediario accidental.

La tabla N° 2, enlista a los principales gusanos planos que parasitan al hombre, pero debe notarse que en la mayoría de los casos se asocian daños patológicos ligeros con su presencia. Sin embargo, ciertas formas císticas larvales (Ej: Echinococcus granulosus) son esencialmente parásitos del ganado. La cisticercosis debida a larvas de Taenia solium puede causar graves enfermedades parasitarias en humanos. (2, 6 y 7)

<u>Especie</u>	<u>Habitat</u>	<u>Estado infectivo</u>
<u>Diphyllobothrium latum</u>	Intestino delgado	Plerocercos
<u>Taenia saginata</u>	Intestino delgado	Cisticerco en - músculo de bovi- no
<u>Taenia solium</u>	Intestino delgado	Cisticerco en - músculo de porci- no
<u>Dipylidium caninum</u>	Intestino delgado	Cisticercos de perros
<u>Hymenolepis nana</u>	Intestino delgado	Huevos en las he- ces de el hombre y los roedores, - cisticercos en varios insectos
<u>Echinococcus granulosus</u> (larva)	Todos los tejidos, principalmente el hígado y los pul- mones	Huevos en heces de perros
<u>T. solium</u> (larva)	Todos los tejidos	Huevos en heces - del hombre

II.2.2.- Nematelmintos.

Clase Nemátoda (gusanos redondos). Los nemátodos son generalmente de una alta organización zoológica en comparación con los tremátodos y los céstodos.

Los nemátodos típicos poseen una cutícula impermeable que encierra músculos longitudinales, fibras nerviosas y un sistema digestivo completo con boca y ano. Los sexos están separados en la mayoría de las especies, aunque se cree que solo las hembras partenogenéticas están presentes en los estados parasíticos de una o dos especies, particularmente Strongyloides.

Aunque las infecciones por nemátodos en perros, bovinos y caballos fueron reconocidas y adecuadamente descritas por Hipócrates, Aristóteles y otros autores, la verdadera significancia del daño causado por estos parásitos en animales domésticos ha sido apreciada solo en tiempos relativamente recientes.

Los nemátodos son divididos en: intestinales, pulmonares y filariales o formas de tejidos, algunos de estos infectan al hombre y están enlistados en la tabla N° 3 (2, 6 y 7).

<u>Ascaris lumbricoides</u>	Intestino delgado	Huevos embrionados en suelo y agua	Hombre
<u>Trichostrongylus axei</u>	Ciego y colon	Huevos embrionados en suelo y agua	Perros, gatos y hombre
<u>Trichostrongylus axei</u>	Ciego y colon	Huevos embrionados en suelo, agua y polvo de casa, etc.	Hombre
<u>Trichostrongylus axei</u>	Intestino delgado	Larvas	Hombre
<u>Trichostrongylus axei</u>	Intestino delgado	Larvas	Perros y gatos.
<u>Trichostrongylus axei</u>	Intestino delgado	Larvas	Hombre
<u>Trichostrongylus axei</u>	Intestino delgado	Larva enquistada en porcinos	Porcinos y hombre
<u>Trichostrongylus axei</u>	Tejido conectivo subcutáneo e intramuscular	Larvas	Hombre
<u>Trichostrongylus axei</u>	Glándulas o vesículas linfáticas	Larvas en varios mosquitos	Hombre
<u>Trichostrongylus axei</u>	Vesículas linfáticas	Larvas en varios mosquitos	Hombre
<u>Loa loa</u>	Tejido conectivo Tejido mesentérico y Peritoneo parietal	Larvas en insectos	Hombre
<u>Onchocerca volvulus</u>	Nodulos subcutáneos y espacios linfáticos.	Larvas en insectos	Hombre

Son agentes terapéuticos usados para destruir parásitos o removerlos del huésped infectado. La mayoría de las infecciones por helmintos se adquieren por contacto con: a) animales infectados; b) contaminación por excremento humano o animal; c) agua infectada con cercarias; y d) ingestión de alimentos infestados.

Para tomar medidas preventivas contra las enfermedades parasitarias, es necesario tener un conocimiento exacto del ciclo de vida del helminto.

En la terapia de estos parásitos se debe considerar la naturaleza del parásito, - el ciclo de vida del helminto, - el sitio de la infección, - el huésped parasitado y el agente químico a ser usado en el tratamiento.

La localización de la infección, debe ser tomada en cuenta antes de designar los agentes químicos a ser usados como anti-helmínticos.

Un antihelmíntico debe tener un amplio margen entre la toxicidad para el parásito y sus efectos tóxicos sobre el huésped. Un fármaco usado en el tratamiento de parasitosis debe ser oralmente activo y preferiblemente efectivo en una dosis. El fármaco también debe ser económico, porque normalmente las parasitosis se dan en la población económicamente inferior.

Los antihelmínticos más importantes utilizados a través del tiempo se enlistan en la tabla N° 4. (8)

Nombre

Arsenicales - - - - - 1904

Antimoniales - - - - - 1918

Hidrocarburos Halogenados - - - - - 1932

Derivados de la Tioxantenona (Análogos de la Lucantona) - - 1946 .

Nitrofuranos - - - - - 1944

Piperazinas - - - - - 1948

(Dietyl carbamazina)

Derivados de la Cianina

Pamoato de pirvinio - - - - - 1956

Fenoles y Bisfenoles Halogenados - - - - - 1956

Pamoato de Befenio - - - - - 1958

Metronidazol - - - - - 1959

Bencimidazoles - - - - - 1960

(Tiabendazol)

Salicilanilidas Halogenados - - - - - 1960

(Niclosamida)

Nombre

Hexahidropirazinoquinolinas - - - - - 1961

(Oxamniquina)

Metiridina - - - - - 1961

Imidazotiazoles - - - - - 1966

(Levamisol)

Tetrahidropirimidinas - - - - - 1966

(Pirantel)

Nitrotiazoles - - - - - 1966

(Niridazol)

Organofosforados - - - - - 1967

Isotiocianatos - - - - - 1969

Imidoil ureas - - - - - 1969

(Carbantel)

Benzotiopirano - indazoles - - - - - 1969

Nitrotiofenos - - - - - 1970

Di tiocarbamato - - - - - 1970

Naf tamidinas - - - - - 1971

(bunamidina)

Nombre

Fenoxialcanos - - - - - 1973

(Diamfenetida)

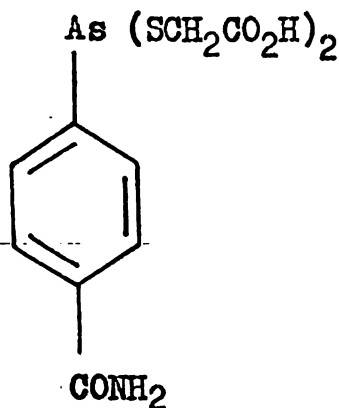
Derivados del Nitrobenceno - - - - - 1976

p - tolueil - fenil - hidrazonas - - - - - 1976

Prazicuantel - - - - - 1977

II.3.1.- Compuestos Orgánicos de Arsénicos.

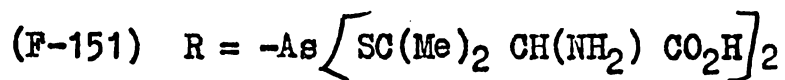
A través del tiempo se han preparado distintos derivados con actividad biológica contra diferentes parásitos, desde 1904 Ehrlich utilizó a los arsenicales aromáticos en quinoterpán, por ejemplo un compuesto llamado "Atozil" (p-amino fenil arsenato de sodio) fue sintetizado en 1905 y demostró actividad contra la tripanosomiasis y la carbasa. Tiene acción antitumoral. Difertazona es efectivo contra triquiuriasis a una dosis de 2 g/día por 10 días en el 96% de los casos clínicos. Finalmente Glicobiasol es efectivo en el tratamiento de Trichuris vulpis en perros. (9y10)



Arsenamida

Ultimamente se utilizan para controlar infecciones provocadas por filarias, aunque se sabe que los derivados del arsénico como la arsenamida, son tóxicos para su uso normal en los perros, esta es recomendada como uno de los fármacos de elección en el tratamiento de Dirofilaria immitis en perros, ya que el fármaco es altamente activo contra microfilaria.

Otros compuestos de arsénico es el Fel W (el arsenio de potasio), uno de los melarsenos desarrollados por Ehrlich, ha demostrado ser efectivo contra varias infecciones provocadas por filarias (incluyendo M. bancrofti, O. volu...), cuando es dado en una dosis por vía intravenosa, aunque, parece ser que hay un alto riesgo de efectos secundarios asociados con el uso de este fármaco. (11)



Un nuevo filiaricida el F-151 también posee actividad tripanocida, aparentemente tiene propiedades microfilaricidas contra Litomosoides carinii. (1 y 12)

II.3.2.- Compuestos de Antimonio.

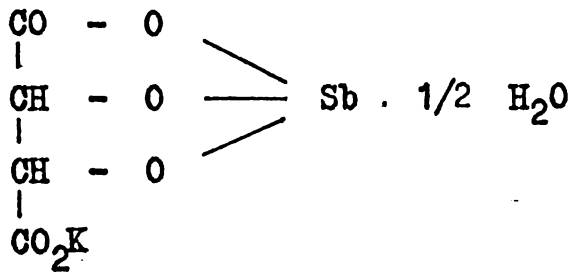
El uso del antimonio en la medicina tiene sus raíces en el pasado ya que fue introducido por Paracelso en el siglo XVI y fue usado como panacea general. Los antimoniales trivalentes fueron introducidos en la terapia de esquistosomiasis en 1918 por Christopherson. Hoy el uso del antimonio es limitado, puesto que todos los compuestos investigados poseen contraindicaciones como son: su toxicidad (cardiotoxicidad), difícil administración y tratamiento prolongado. (13)

Los compuestos utilizados, tartrato de potasio y antimonio o tartrato de sodio y antimonio, son efectivos contra todas las especies de esquistosomas humanas, pero el tratamiento debe ser individual y estos fármacos no pueden ser usados en campañas masivas de quimioterapia. (14)

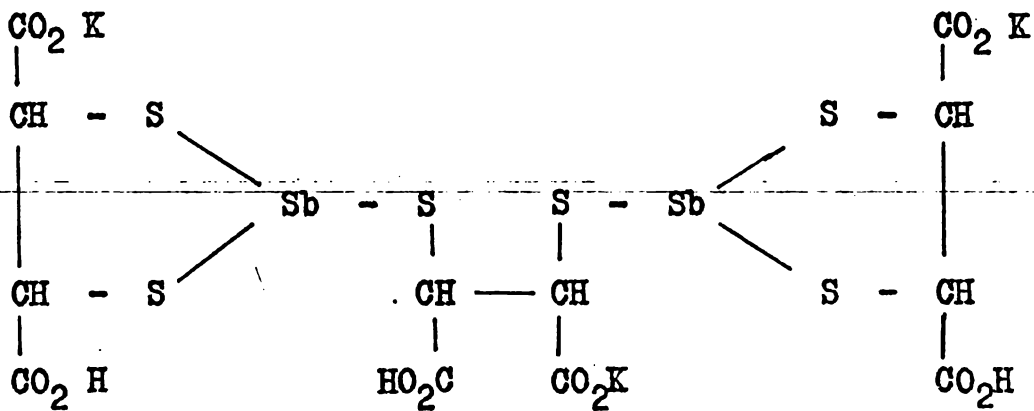
Dimercaptosuccinato de Antimonio es efectivo por vía intramuscular contra las tres especies de esquistosomas humanos. Otros antimoniales que han sido utilizados en humanos incluyen bis-(pirocatecol-3,5-disulfonato) de sodio y antimonio (Stibophen) y Tiomolato de litio y antimonio (Antiomolins). Relaciones estructura-actividad (REA), entre compuestos de antimonio y factores involucrados en la eficacia de algunos de estos fármacos han sido revisados. (15)

Debido a los síntomas tóxicos producidos por los compuestos

tos orgánicos de antimonio, se han hecho intentos por aumentar el índice terapéutico por quelación con Penicilamina, pero conservan su toxicidad inherente, lo cual impide su uso como quinioterápicos masivos. (1 y 16. y 17)



Tartrato émético



Dimercaptosuccinato de Antimonio y Potasio.

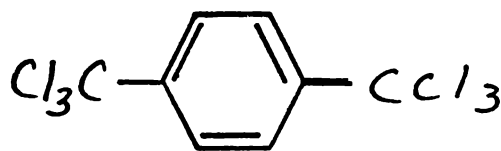
II.3.3.- Hidrocarburos Halogenados.

El fármaco usado por muchos años en una escala masiva para el tratamiento de fascioliasis en borregos es Tetracloruro de carbono. Se cree que actúa bloqueando la biosíntesis de colesterol en el huésped y se ha encontrado que correlaciona con el postulado de que F. hepática es con toda probabilidad, completamente dependiente del huésped para suplir sus necesidades de colesterol. También se ha sugerido que la actividad espasmogénica inducida por tetracloruro de carbono y su metabolito cloroformo puede contribuir a la actividad fasciolicida del fármaco. (18)

El otro hidrocarburo alifático halogenado de uso general es el Hexacloroetano, aunque este fármaco no es espasmogénico per se, sus principales metabolitos Pentacloroetano y Tetracloroetileno tienen una potente actividad contra F. hepática in vitro; pentacloroetano es aproximadamente dos veces más potente que el tetracloruro de carbono. (19)

En general los hidrocarburos alifáticos halogenados son solamente activos contra F. hepática.

En contraste con los hidrocarburos aromáticos halogenados son agentes de amplio espectro antitremátodos. Por Ejemplo; 1,4-bis (triclorometil) Benceno (Hetol) es efectivo contra : F. hepática; D. dendriticum; O. felineus; C. sinensis, también F. buski y especies de Paragonimus.



Hetol

La mayoría de los fasciolicidas han demostrado ser desacopladores de la fosforilación oxidativa y el Hetol no es la excepción. Este fármaco ha sido utilizado en el tratamiento de humanos en infecciones por C. sinensis o Opisthorchis spp., y es bien tolerado; sin embargo, ha sido descartado porque produce una

nia hipocrémica en perros y consecuentemente es peligroso utilizarlo en el tratamiento de estas infecciones. (20)

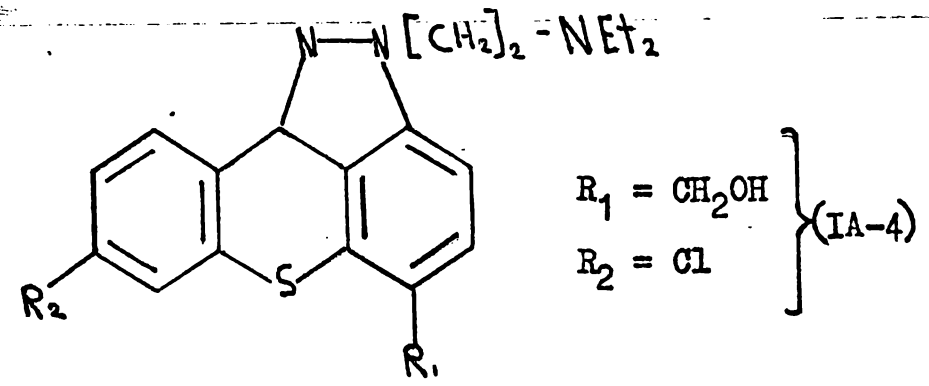
II.3.4.- Derivados de la Tioxantenona. Análogos de la Lucantonā.

El primer avance real en la quimioterapia de la esquistosomiasis, se dió en los años treinta con el reconocimiento por parte de Kikuth y Gönmert en los laboratorios Bayer, de ciertas Tioxantenonas con eficacia experimental contra S. mansoni en ratón, lo cual llevó a la preparación de los Miracilos preparados por Mauss a partir de la Lucantonā, surgiendo el Miracil D como el primer esquistomicida no metálico, administrado oralmente. Por desgracia los efectos secundarios fueron demasiados severos, lo cual limitó su aceptación. (21)

Después se prepararon los Mirasanos que son derivados de los Miracilos, sin obtener mejores resultados, sin embargo se continuó la investigación buscando metabolitos de la Lucantonā que fueran activos y en un cultivo de hongos obtuvieron a la Hycantonā, la cual es más potente que el compuesto padre. (22)

La Hycantonā administrada a humanos como sal de Metansulfonato (Etrenol) tiene buena eficacia contra S. mansoni y S. hematobium en una sola dosis por inyección intramuscular de 3 mg/Kg pero tiene efectos secundarios como náusea, vómito, dolor abdominal, dolor de cabeza, disnea, daño sobre el hígado, además después de hacer estudios se encontró que es mutagénico y teratogénico, induce entrecruzamiento mitótico profago, cambios citogénicos y transformaciones malignas. (23)

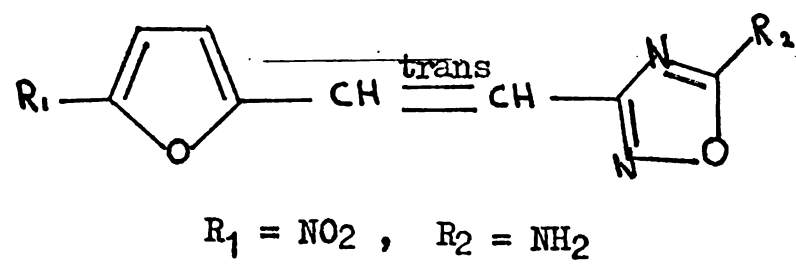
Posteriormente investigadores de Parke Davis prepararon una serie de Benzotioopyrano (4,3,2-cd) indazoles, los cuales fueron igualmente potentes que la Hycantonā contra S. mansoni en ratón en administración oral e intramuscular, pero presentan el problema de ser mutagénicos, después prepararon N-oxidos de la cadena lateral amina, los cuales tienen menor actividad mutagénica que la hycantonā y mayores efectos contra Schistosoma. (24)



II.3.5.- Nitrofuranos.

Aunque muchos de estos compuestos son activos contra bacterias y protozoarios, solo ciertos derivados poseen actividad contra helmintos. Uno de ellos con propiedades esquistosomicidas, derivado de la Isopropilamida fue uno de los primeros candidatos clínicos, el cual aunque es efectivo para el tratamiento de S. japonicum tiene efectos colaterales graves.

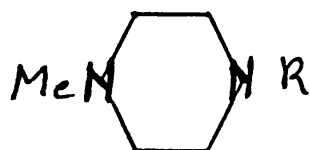
Uno de los más nuevos compuestos experimentales es el trans-5-amino-3-(2-(5-nitro-2-furil)-vinil)-1,2,4 oxadiazol, el cual ha sido investigado como un esquistosomicida por Buending y sus colaboradores, encontrando que presenta actividad contra S. mansoni y S. japonicum, pero también demostrando mutagenicidad en levaduras y carcinogenicidad. (25-27)



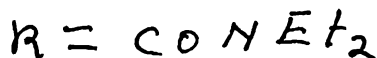
23
--II.3.6.- Piperazinas.

El desarrollo de la piperazina como antihelmíntico para el tratamiento de infecciones, esta asociado con muchas sales y derivados de este compuesto. (28)

La piperazina parece ser el agente antihelmíntico ideal, ya que ciertamente no es tóxico a niveles de dosis terapéuticas, - además es económico y fácil de preparar en fórmulaciones convencionales. Consecuentemente, después de muchos años sigue siendo uno de los fármacos a escoger en la terapia de infecciones causadas por *Enterobius vermicularis* y *Ascaris*. (29)



Piperazina



(Diethylcarbamazina)

La piperazina ha demostrado bloquear la transmisión neuro - muscular en Ascaris por medio de una acción anticolinérgica en - la unión mioneural, aunque este efecto es reversible si los gusa - nos tratados son removidos a un medio libre de piperazina. Los - gusanos paralizados son incapaces de realizar los movimientos - peristálticos del intestino delgado y son arrojados del tracto - gastrointestinal y excretados en las heces. Además este fármaco también inhibe algunas enzimas glicolíticas en especies de Asca - ris. (30 y 31)

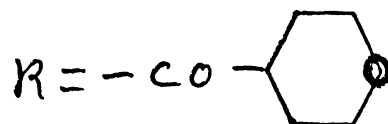
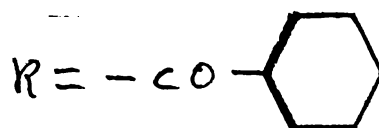
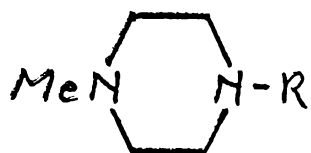
Una amplia variedad de derivados y sales han sido preparados a partir del descubrimiento de las propiedades antihelmínticas - de este compuesto, sin embargo a la fecha ningún derivado parece ser superior a la piperazina.

En 1948 en los laboratorios Lederle de American Cyanamid se preparó el ester etílico del ácido 4-metil-1-piperazincarboxíli - co, el cual demostró ser un potente filiaricida extendiéndose - las investigaciones encontraron que el más potente es el deriva - do N,N-dietilamida del ácido, el cual ingresó al uso clínico co -

mo Dietilcarbamazina (DEC), éste es el primer agente terapéutico para el tratamiento de Filariasis de Bancroftia y Malaya, pero es esencialmente activo contra microfilarias solamente. En Onco-cercosis es también altamente efectivo, pero presenta reacciones anafilácticas. (32)

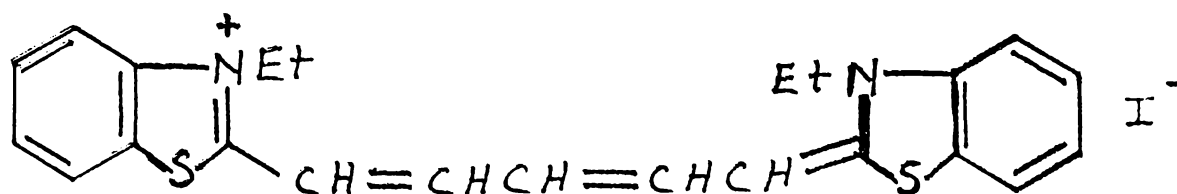
El modo de acción de DEC indica que afecta la cutícula de las microfilarias.

También se ha utilizado en veterinaria para el tratamiento de gusanos pulmonares en borregos (Dyctyocaulus filaria) y en vacas (D. viviparus).



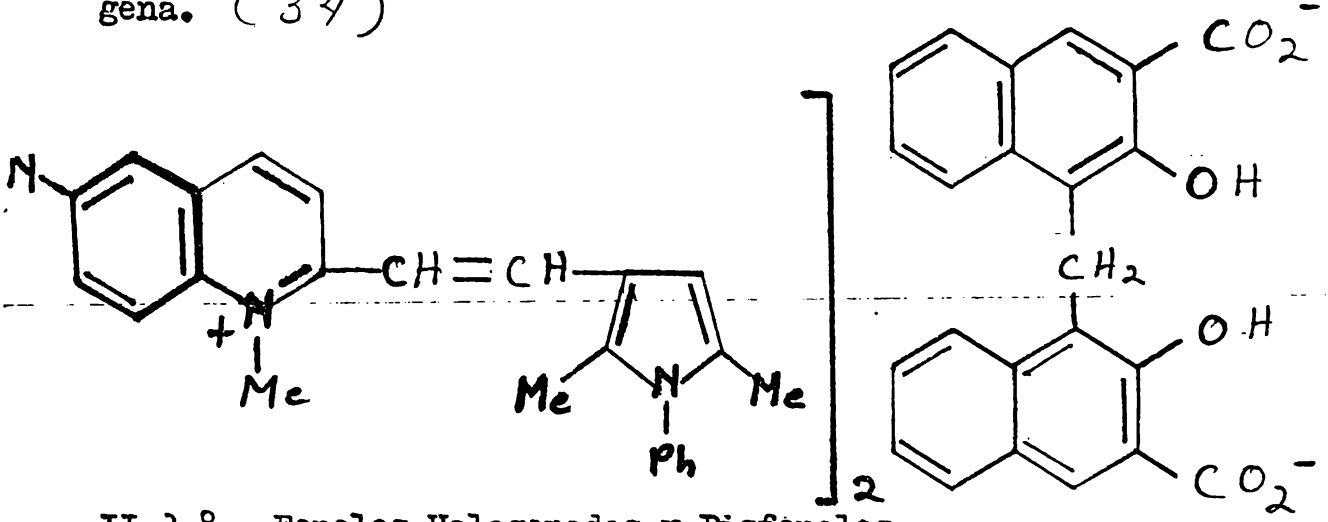
II.3.7.- Derivados de la Cianina.

El Yoduro de ditiazanina tiene buena actividad contra Ascaris y también contra Strongyloides stercoralis en humanos sin embargo el fármaco produce severos efectos colaterales gastrointestinales. (33)



Yoduro de ditiazanina

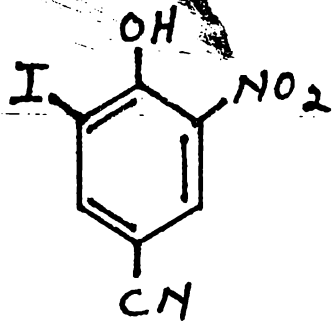
El Pamoato de pirvinio es un colorante de Cianina asimétrico, posee potente actividad contra Enterobius vermicularis y es generalmente aceptado como uno de los fármacos de elección para una sola dosis en el tratamiento de infecciones ya que inhibe la captura de oxígeno e interfiere con la absorción de glucosa exógena. (34)



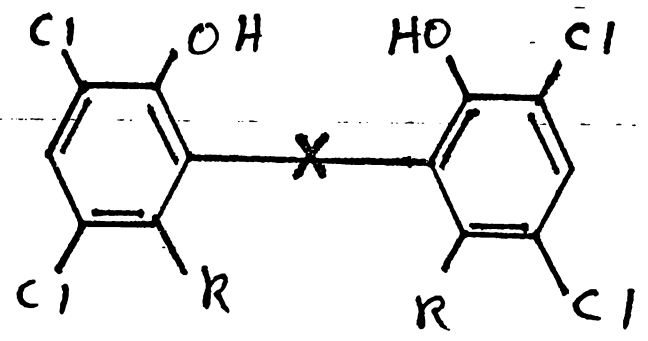
II.3.8.- Fenoles Halogenados y Bisfenoles.

El 4-ciano-2-yodo-6-nitrofenol (Nitroxinil, Trodax) es uno de los fasciolicidas más ampliamente usados. Tiene la ventaja de ser administrado parenteralmente y es activo contra fasciolas - adultas de más de 6 semanas, sin embargo el fármaco tiene el efecto de tinción del tejido y persiste por mucho tiempo por lo cual no permite su uso en ganado lechero. (35)

Un grupo de fasciolicidas que es empleado en mayor o menor grado en medicina veterinaria, incluye a los compuestos bisfenólicos que pueden contener varios halógenos y/o grupos nitro como sustituyentes y pueden tener a los anillos aromáticos unidos a través de un grupo metileno o un átomo de azufre, etc., en esta categoría se debe incluir al Bitionol, Hexaclorofeno y al más activo de estos fármacos el Bromofenfos, el cual se utiliza casi exclusivamente en Holanda. El Hexaclorofeno es barato y actúa bien sobre gusanos mayores de 7 a 8 semanas pero su índice terapéutico es pobre. (36)

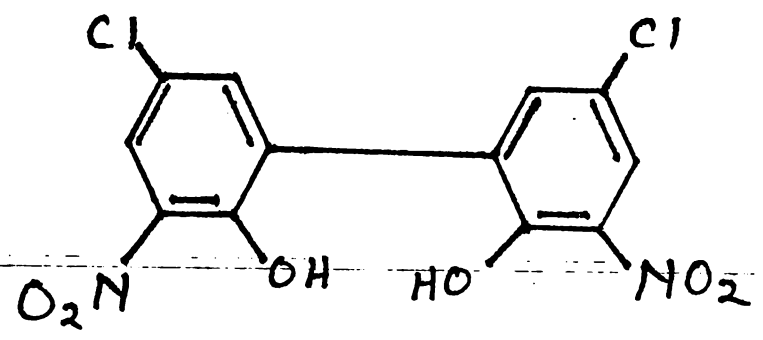


Nitrocinil



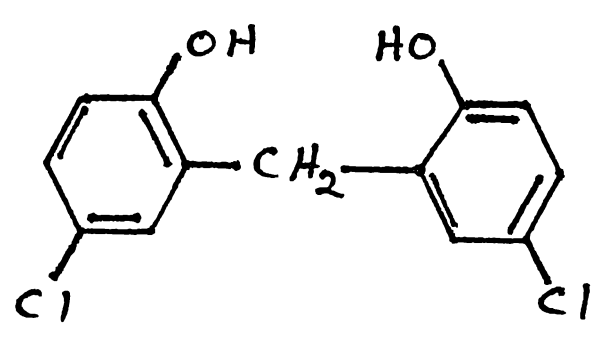
R = H, X = S (Bitionol)

Bayer preparó un derivado bisfenólico llamado Meniclofolan (Bayer 9015, Bilevon/M, Niclofolan) para el tratamiento de ganado vacuno. Una formulación especial fue desarrollada (Bilevon - R), que previene el metabolismo del fármaco en el Rumen.



Parece ser que el Bitionol es de interés especial ya que es probablemente el fármaco a escoger para infecciones por F. hepática en humanos.

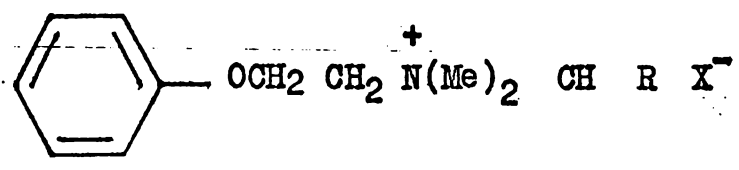
Diclorofen fue introducido en 1956 para uso en humanos, después de muchos años se utiliza como taenicida veterinario ya que es muy efectivo en el tratamiento de infecciones por diferentes especies de Taenia y céstodos de los pescados siendo la proporción curativa alta y los efectos colaterales medianos. Su forma de actuar es produciendo peristaltismo con lo cual se remueven fragmentos del gusano hasta que se desintegra. (35)



La mayoría de los compuestos bisfenólicos halogenados son potencialmente usados como taenocidas, pero han sido reemplazados por la Niclosamida en el tratamiento contra Céstodos en Humanos?

II.3.9.- Hidroxipamoato de Befenio.

Aunque este compuesto fue introducido a la clínica humana hace mucho tiempo se mantiene como el fármaco de elección en el tratamiento de infecciones por Ancylostoma duodenale y Necator americanus, además tiene la ventaja de ser efectivo contra Ascaris lumbricoides y Trichostrongylus spp., cuando es administrado en una sola dosis oralmente. Relaciones estructu-
ra-actividad (EAA) existen en esta serie de compuestos y a partir de éstos y trabajando con agentes antihelmínticos veterinarios surge el Closilato de Tenio para uso en perros. (37)



R = Ph, X = 3-hidroxi-2-naftoato
Hidroxipamoato de Befenio

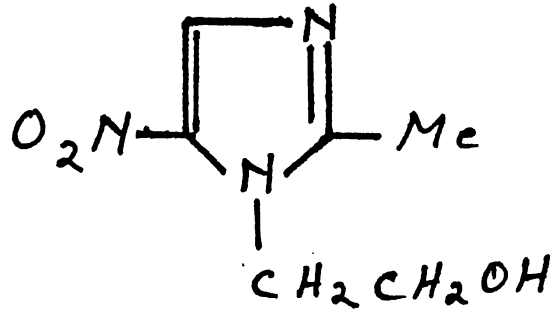
R = 2-tienil, X = p-clorobencensulfonata
Closilato de tenio

Un análogo del Befenium desarrollado en la Unión Soviética es el Difezil, el cual parece ser efectivo contra la triquiuriasis en humanos.

II.3.10.- Metronidazol.

Este compuesto fue inicialmente introducido como triconomi

cida y aunque ahora es el fármaco de elección contra la amibiasis, también puede ser utilizado contra otros parásitos como es el caso de Dracunculus medinensis, etc. (38)



Metronidazol

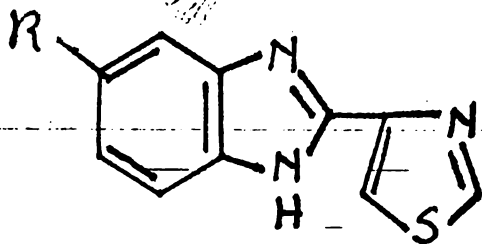
II.3.11.- Bencimidazoles.

En 1961 los laboratorios Merck introdujeron el (2-(4-tiazolil)-bencimidazol) Tiabendazol, como el primero de los nematocidas gastrointestinal de amplio espectro usado para la erradicación de los nemátodos intestinales, con la posible excepción de Trichuris trichiura. (39)

In vitro el tiabendazol parece inhibir el sistema enzimático de la fumarato reductasa de Hemonchus contortus susceptibles.

In vivo, el fármaco tiene una acción claramente definida antiinflamatoria y ha sido postulado que esto puede contribuir favorablemente a la respuesta clínica en el hombre.

Varios análogos de este compuesto en los cuales la parte del bencimidazol es sustituido en la posición 2 por un anillo aromático o un anillo heteroaromático también han demostrado tener propiedades antihelmínticas. Los congéneres del tiabendazol en los cuales el grupo bencimidazol ha sido reemplazado por otro sistema anular heterocíclico incluyendo Imidazo (1,2-a) piridinas y varios azaindazoles son en general menos activos que el compuesto padre. Parece ser que Tiabendazol tiene la desventaja de ser rápidamente inactivado por hidroxilación en la posición 5, esto ha sido demostrado en borregos. (40)



$R = H$ (Tiabendazol)

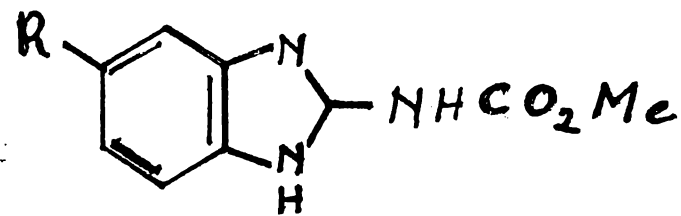
$R = i-PrO \cdot CONH$ (Cambendazol)

Como parte de un programa extensivo de investigaciones sobre las modificaciones estructurales del Tiabendazol, culminaron con el compuesto más activo derivado del estudio que fue el 5-isopropoxicarbonil amino llamado Cambendazol el cual es menos tóxico y varias veces más potente que el Tiabendazol conservando su amplio espectro. También es efectivo en prevenir el desarrollo de larvas y huevos. (41)

El descubrimiento de Tiabendazol estimuló el desarrollo del área de los bencimidazoles en diferentes compañías, lo cual dió como resultado en los laboratorios Smith, Kline and French con la introducción del Parbendazol, el cual posee propiedades Tera_utogénicas cuando es administrado a borregos con embarazo temprano, además es el primer agente antihelmíntico derivado del bencimidazol que contiene el grupo de metil carbamato en la posición 2. Después de la introducción de dicho compuesto Janssen Farmacéutica produjo Mebendazol, el cual ha confirmado su amplio espectro como antihelmíntico, especialmente usado contra Trichiuris trichiura y Enterobius vermicularis, aunque también es activo contra otros nemátodos y céstodos. Se cree que actúa bloqueando irreversiblemente la captura de glucosa por los nemátodos en el colon. (42-44)

Posteriormente se desarrollaron varios derivados los cuales incluyen al Oxibendazol, Fenbendazol, oxfendazol, albendazol, es_u últimos tres se caracterizan por su potencia ya que no solo son activos contra helmintos gastrointestinales sino también contra

gusanos pulmonares como Dictyocaulus viviparus, además Albendazol es activo contra Fasciola hepática y gusanos planos del género Moniezia. (45)



- R = n-Bu (Parbendazol)
- R = Ph CO (Mebendazol)
- R = n-Pr O (Oxibendazol)
- R = Ph S (Fenbendazol)
- R = Ph S O (Oxfendazol)
- R = n-Pr S (Albendazol)

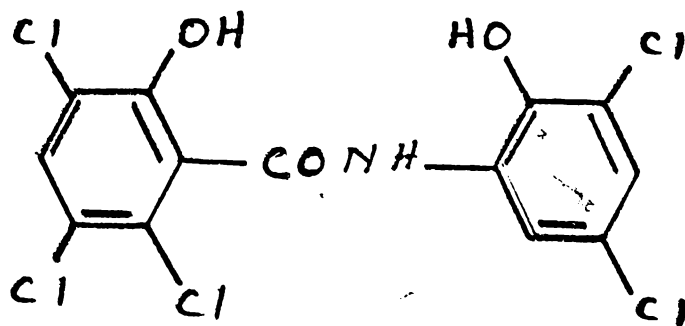
Obviamente los bencimidazoles representan un grupo extremadamente interesante dentro de los agentes antihelmínticos, - su potencial en el futuro dependerá de la habilidad de preparar nuevos derivados para mantener completa eficacia contra las especies de nemátodos resistentes a los bencimidazoles los cuales han aparecido en varias partes del mundo.

II.3.12.- Salicilanilidas Halogenadas.

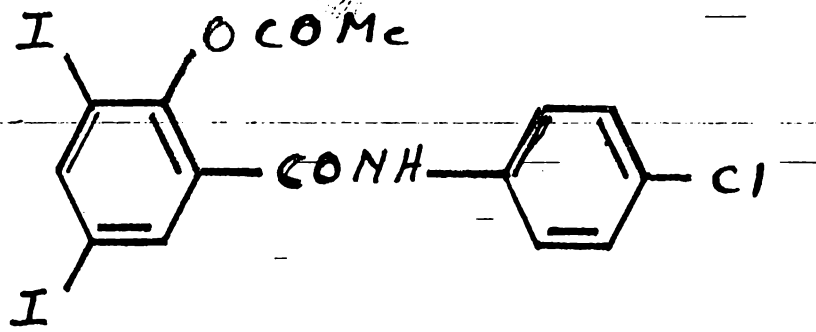
Representan otro grupo de activos fasciolicidas, aunque no es claro si estos compuestos son meramente extensiones de

los bisfenoles, en las cuales el puente entre los anillos aromáticos está dado por un grupo amida ($-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\overset{\text{H}}{\text{N}}-$) mayor que un metileno ($-\text{CH}_2-$) o un azufre ($-\text{S}-$).

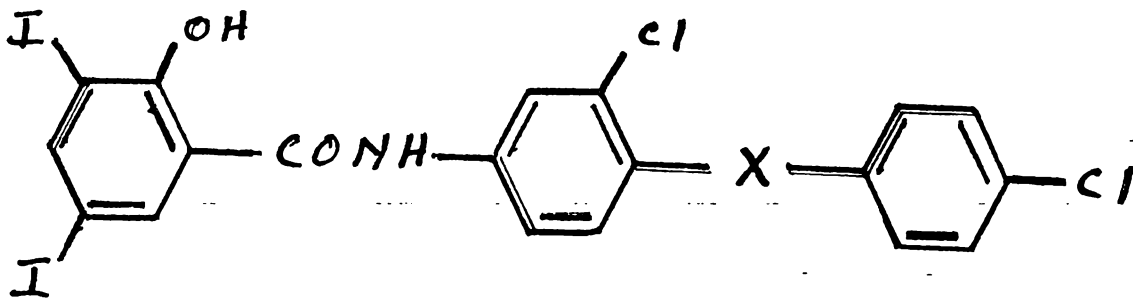
En este grupo los más activos son : Oxiclozanida, Clioxanida, Rafoxanida y el nuevo Brotianida de la tiosalicilanilida. Todos estos compuestos son desacopladores de la fosforilación oxidativa y con la excepción de Rafoxanida son activos contra parásitos adultos solamente (fasciolas de 9 - 10 semanas situadas en conductos biliares), aunque Rafoxanida no puede ser usado en vacas diariamente tiene la ventaja de poseer un espectro más amplio de actividad que otros fasciolicidas, ya que también es efectivo contra Haemonchus contortus y la mosca voladora de las ovejas Oestrus ovis. Estudios detallados de la Relación estructura actividad (REA) se han realizado, los cuales sugieren que la actividad fasciolicida está en función de la capacidad del compuesto para formar sistemas de oxido-reducción. Trabajos sin publicar indican que el modo primario de acción puede ser acción directa o indirecta sobre el sistema nervioso de las fasciolas posiblemente por interferencia con el metabolismo energético del nervio. Existen más estudios de REA con otros derivados de 2,6-dihidroxi -benzanilidas (3-resorcil-anilidas), en los cuales fue determinada la actividad contra la enzima succinato deshidrogenasa de la fasciola y al realizar el analisis según Hansch se establecieron relaciones cuantitativas estructura-actividad (RQA), dicho trabajo se llevó hasta encontrar uno de los análogos más potentes 2,6 dihidroxi-3,4',5-tricloro benzanilida. (46-50)



Oxiclozanida

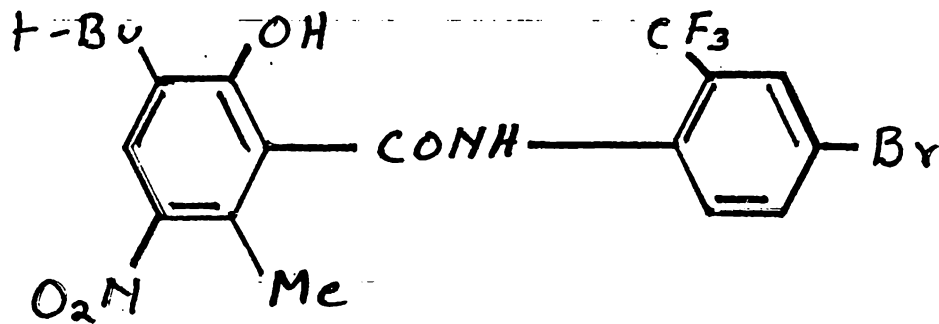


Clloxanida

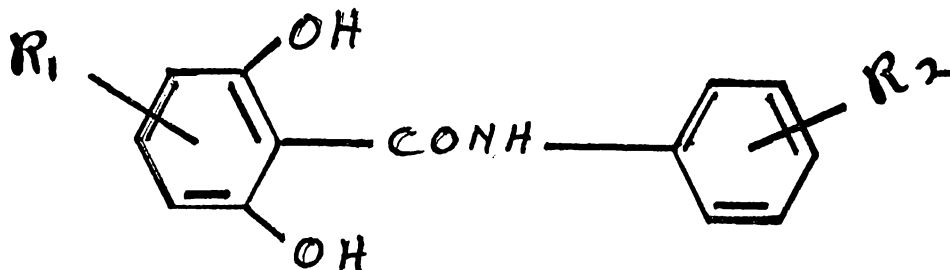


$X = O$ Rafoxanide

$X = CO$ Salantel



Bromoxanide



$R_1 = 3,5-Cl_2$; $R_2 = 4-Cl$

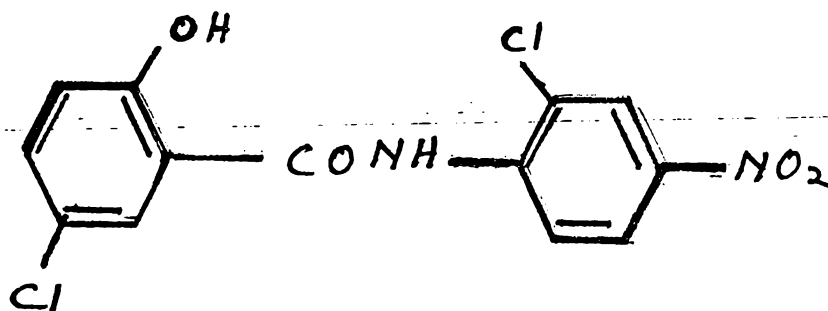
Por otra parte estos compuestos fueron introducidos a la medicina hace algunos años por medio de la 2',5-dicloro-4'-nitrobenzoinilida (Nicolosnida), el cual es el fármaco de elección para el tratamiento de todas las especies de gus-

nos planos o sea es el más favorecido en infecciones por Céstodos. (51)

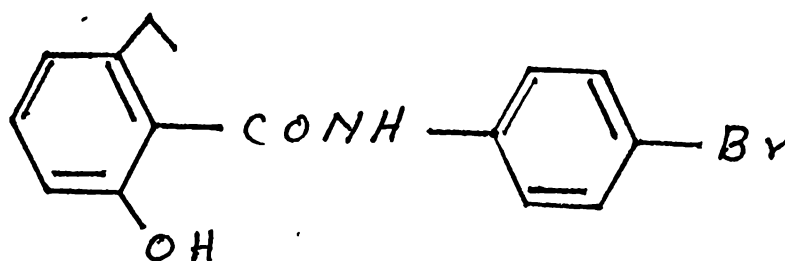
Niclosamida es también un potente molusquicida, como la sal de etanolamina este fármaco es particularmente efectivo contra Biomphalaria glabrata que es un caracol huésped intermediario de esquistosomiasis.

Aunque los estudios de REA sobre Niclosamida han establecido que el grupo hidroxilo en el ácido benzoico tiene que ser en la posición 2, los trabajos se han ampliado hacia las 2,6-dihidroxibenzanilidas antes mencionadas. (52, 53)

Optima actividad anticéstodos fue observada para 4'-bromo-2,6-dihidroxibenzanilida, el cual ingresó a la medicina veterinaria ya que es interesante por su actividad contra las especies de Paraphistomonum. (54)

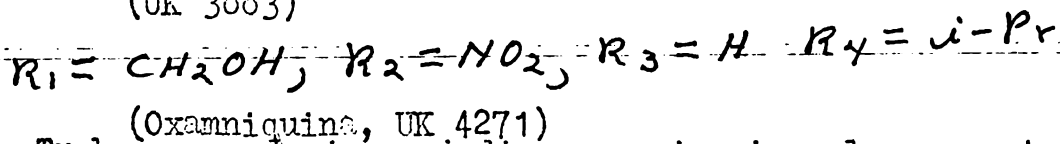
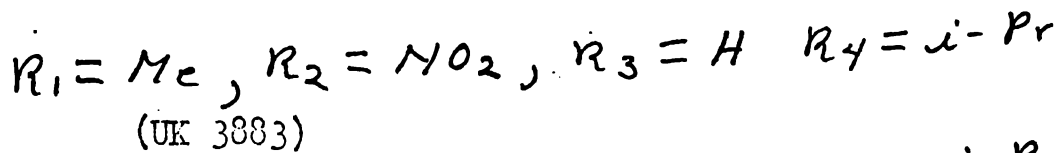
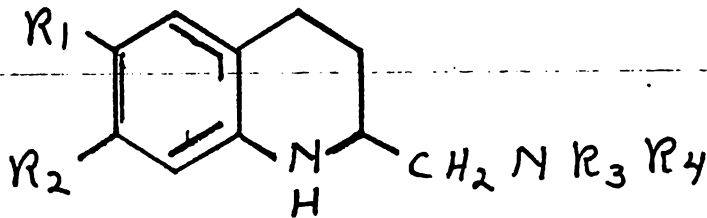


Niclosamida



Resorantel

Esta serie es una alternativa conformacionalmente hablando para controlar la esquistosomiasis, desarrollada por Pfizer, obteniendo después de muchas pruebas un derivado muy activo que fue el 2-((isopropilamino) - metil)-6-metil-7-nitro-1,2,3,4-tetrahydroquinolina. (55)

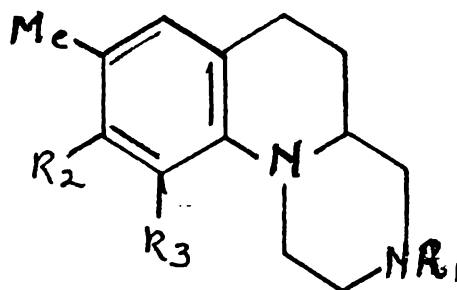
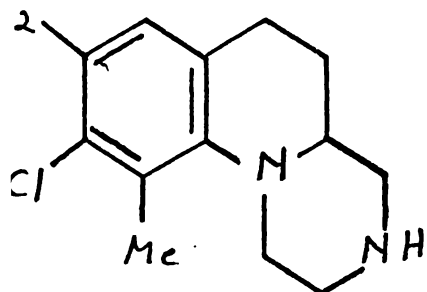


Trabajos posteriores, indican que in vivo el compuesto anterior es metabolizado al correspondiente hidroximetil análogo, el cual fue extremadamente potente contra S. mansoni en roedores y primates, fue subsecuentemente introducido a la medicina clínica como Oxamniquina. Originalmente como un fármaco parenteral lo cual produce fuerte dolor en el lugar de la inyección y ha sido reformulado para administración oral. (56)

En la clínica ha demostrado tener efectividad en el tratamiento de S. mansoni, aunque tiene poca actividad contra S. haematobium y ninguna contra S. japonicum, en Sudamérica se recomienda una sola dosis de 12 mg/kg para pacientes de menos de 40 kg y 15 mg/kg para pacientes de más de 40 kg, es bien tolerado aunque algunas veces provoca náuseas, vómito y vértigos o mareos, tanto como se incrementan los niveles de transaminasas en suero. En Rodesia se ha demostrado que se requiere administrar una dosis total de 60 mg/kg dando 4 dosis iguales durante 2 días para lograr la cura satisfactoria. (57)

14.- Hexahidro pirazinoquinolinas.

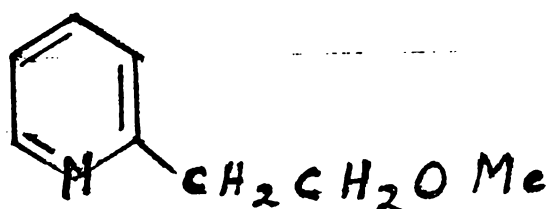
En una extensión del trabajo de Oxamniquina, Richard y colaboradores prepararon una variedad de 8-metil pirazinoquinolinas algunas de las cuales fueron más activas que la Oxamniquina. Haciendo un detallado examen de las REA de estas series se encontró que el 9-cloro-8-hidroximetil-10-metil-2,3,4,4a,5,6-hexahidro-1H-pirazino (1,2-a)-quinolina, el cual fue dos veces más potente que la Oxamniquina. (59)



9-cloro-8-hidroximetil-10-metil-2,3,4,4a,5,6-hexahidro-1H-pirazino (1,2-a)-quinolina.

Estos compuestos son efectivos contra las primeras fases de desarrollo de S. mansoni y poseen actividad profiláctica.

Fue introducida como un agente antihelmíntico por ICI, en 1961, aunque tiene baja toxicidad, no tiene un amplio espectro de actividad, parece un débil bloqueador despolarizante de la transmisión neuromuscular, además de ser débil inhibidor de colinesterasas. (60, 61)



Metiridina

III.3.16.- Imidazotiazoles.

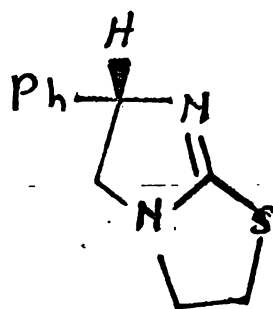
Tetramisol y Levamisol.

En 1966 el segundo agente antihelmíntico de amplio espectro fue introducido por Janssen Farmacéutica, la publicación original indica que es ampliamente efectivo contra nemátodos gastrointestinales en muchas especies de animales incluyendo pájaros y tigres. (62, 63)

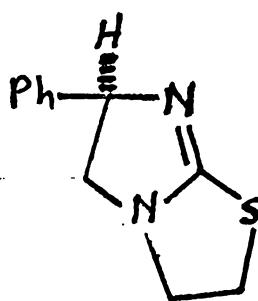
El descubrimiento de este compuesto se debió a otro el Tiazotienol, el cual demostró poseer buena actividad nematocida en roedores.

Después todos los metabolitos del Tiazotienol que fueron aislados y sintetizados, resultaron inactivos contra nemátodos excepto Tiazotielito, este fármaco fue mucho más potente que su precursor aunque es muy caro y tiene limitada solubilidad en agua, un análogo el 4,1-2,3,5,6-tetrahidro-6-fenilimidazo (2,1-b)-tiazol (Tetramisol), fue desarrollado a partir de una gran

serie de Imidazo (2,1-b) Tiazoles, además las investigaciones demostraron que la mayoría de la actividad antihelmíntica del Tetramisol racémico reside en el isómero levorrotatorio (Levamisol), el cual es varias veces más potente, pero no más tóxico que el isómero dextrorrotatorio (Dextramisol). En adición su principal modo de acción como un potente inhibidor estéreo específico de la fumarato reductasa en varios nemátodos incluyen do cepas de Haemonchus contortus resistentes a Tiabendazol. - Además el Levamisol tiene interesantes propiedades bioquímicas: a bajas concentraciones inhibe las fosfatasas alcalinas de mamíferos, restablece los mecanismos de defensa del huésped y tiene un valor terapéutico potencial como un inmuno estimulante, el isómero dextrorrotatorio puede ser utilizado como antidepresivo. (64, 65)



Levamisol



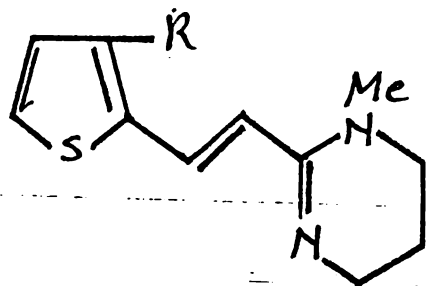
Dextramisol

Tetramisol

II.3.17.- Tetrahidropirimidinas. Pirantel, Morantel y Oxantel.

El descubrimiento de la actividad antihelmíntica en la sal de Isotiouonio, inicio el programa de trabajo en los laboratorios Pfizer en la síntesis de análogos de este compuesto, el cual tiene poca actividad debido a que se hidroliza rápidamente, lo que llevó al descubrimiento de amidinas cíclicas con buena actividad antihelmíntica, culminando con la introducción del Pirantel y Morantel como agentes antihelmínticos de amplio espectro. (66)

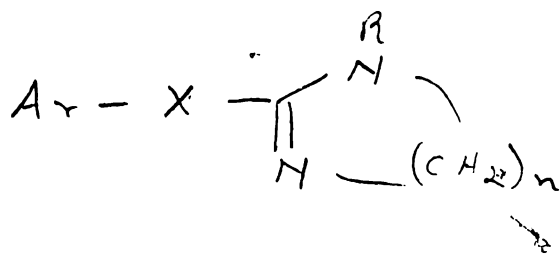
En medicina humana se utiliza la sal, pamoato de pirantel, insoluble en agua, y para uso veterinario se emplea normalmente el tartrato soluble en agua, este fármaco es efectivo contra un amplio rango de nemátodos intestinales y ciertamente es uno de los fármacos de elección para el tratamiento de infecciones humanas. (, 39)



R = H (Pirantel)

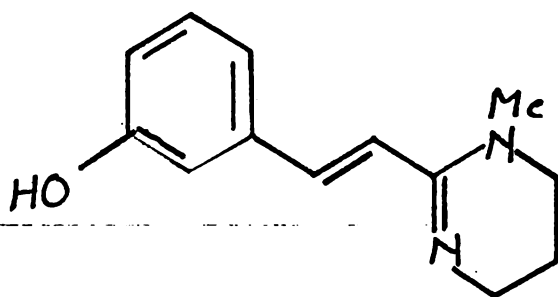
R = Me (Morantel)

Estudios de REA sobre los análogos del Pirantel indican que de acuerdo a la siguiente fórmula general, los diferentes valores de actividad antihelmíntica dependen del radical aromático y sigue el orden de 2-tienil > 3-tienil > fenil > 2 furil, la máxima actividad se encuentra en derivados con anillos de seis miembros, tetrahidropirimidinas (n = 3). En suma la máxima eficacia fue establecida para compuestos en los cuales X fuera trans - CH = CH - . En estos estudios, un análisis de Hansch reveló buena correlación entre la lipofilia y la actividad biológica. (67)



Ciertos estudios sobre sales de 1-(2-arylvinil) piridinio, amidinas no cíclicas y algunas dihidrotiazinas, fueron realizados pero no se encontró ningún compuesto superior a Pirantel o Morantel.

Más interesante fue el descubrimiento de la actividad de antinematodos en algunos m-hidroxifenil derivados del Pirantel, aunque el compuesto padre presenta poca actividad contra gusanos adultos (*Trichiuris spp.*), el análogo más activo fue Oxantel, el cual demostró ser efectivo en triquiuriasis clínica severa. (68, 69)



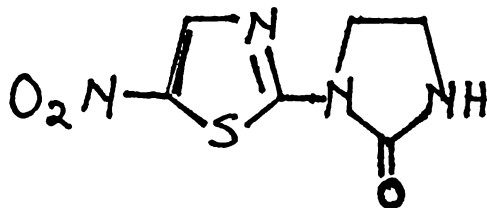
Oxantel

El mecanismo de acción de Pirantel y Morantel se debe a que actúa como despolarizante neuromuscular, es un agente bloqueador, que estimula ganglios y también posee acción parecida a la de acetilcolina sobre músculo liso. (70, 71)

II.3.1°.- Nitrotiazoles.

2

y fue preparado por síntesis como parte de una investigación sistemática de compuestos heterocíclicos nitrados con potencial de agentes antiparasíticos. (72)



Niridazol

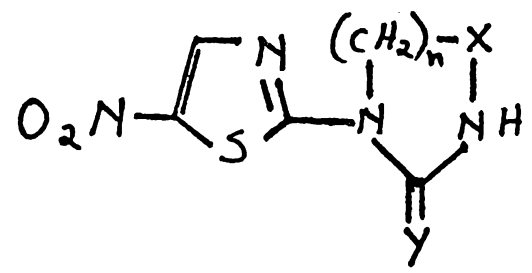
Este compuesto es altamente efectivo para el tratamiento de S. haematobium pero es menos activo contra S. mansoni. El fármaco es administrado oralmente a 25 mg/kg/día (dividido en dos dosis) por un período de 5 a 10 días y es usualmente bien tolerado, especialmente por los niños. Los efectos colaterales son generalmente medianos e incluyen náusea, vómito y anorexia. Más serias son las reacciones neuropsiquiátricas (manía, desorientación mental, convulsiones generalizadas, etc.) y cambios en el encefalograma. (73)

La utilidad del fármaco en quimioterapia depende de la habilidad de cada individuo para metabolizarlo. Hay buena evidencia de que el fármaco sin modificaciones es el responsable de la actividad y de la toxicidad, por lo tanto ya que en infecciones por S. mansoni la probabilidad de que el hígado no funcione normalmente no se recomienda para uso masivo. (74)

Además recientes ensayos establecen que el fármaco actúa como sustancia mutagénica en el húnguido y además el Niridazol ha demostrado ser carcinogénico en el ratón. (75)

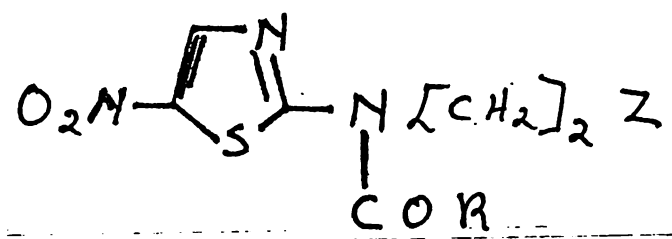
REA asociados con Niridazol, indican que compuestos con un anillo de Imidazolidina modificado poseen buenas propiedades esquistosomicidas en animales experimentales y en particular el Imidazolidinotona, la cual fue reportada como menos tóxica que el Niridazol en un número limitado de pacientes. Uno de

los requerimientos para la actividad de todos los congeneres es la presencia del grupo nitro en la posición cinco. (76)



- $Y = O, X = CO, n = 1$
- $Y = O, X = CO, n = 2$
- $Y = S, X = CH_2, n = 1$

Muchos derivados han sido probados encontrándose que las (5-nitro-2-tiazolil) amino propionamidas, parecen poseer buena actividad contra S. mansoni en ratón. (77)



- $R = Me, Z = CONH_2$
- $R = Pr, Z = CONH_2$
- $R = Et, Z = CONH_2$
- $R = ClCH_2, Z = CONH_2$
- $R = NH_2, Z = CN$
- $R = NH_2, Z = CONH_2$

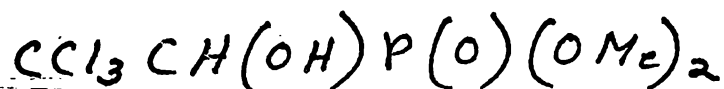
II.3.19.- Compuestos Organofosforados.

Aunque se sabe que los inhibidores de la colinesterasa clásicos son inactivos como esquistosomicidas el insecticida 0,0-dimetil-1-hidroxi-2,2,2-tricloro etil fosfonato (Metrifonato) es una interesante adición a la pequeña selección de esquistosomicidas de uso clínico ya que ha sido altamente efectivo en el tratamiento de S. haematobium en dosis orales de 7.5 mg/kg

44

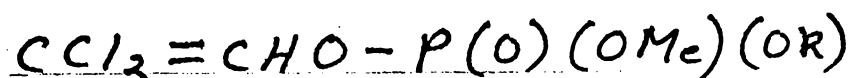
repetidas en intervalos de 14 días (un total de 3 dosis). El fármaco no tiene efecto sobre S. mansoni. (78)

Este fármaco como único efecto colateral presenta la disminución de colinesterasas en sangre y parece ser mutagénico - según pruebas con Salmonella typhimurium. (58)



Metrifonato

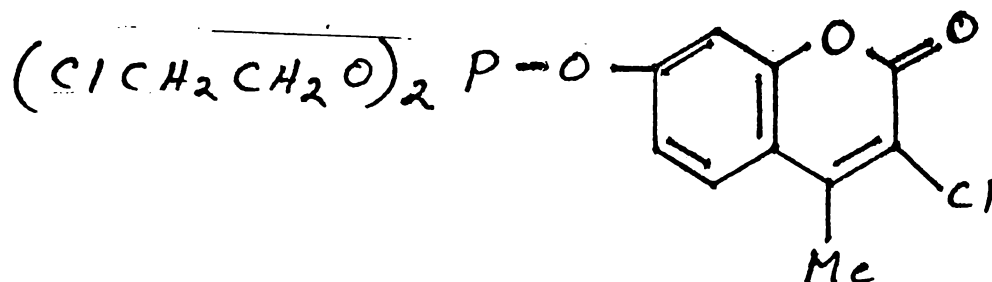
Los agentes antihelmínticos organofosforados, son todos - potentes inhibidores de colinesterasas, consecuentemente ellos dependen de su acción selectiva sobre el parásito. Para uso veterinario se ha utilizado como nematocida Diclorvos. (79, 80)



$\text{R} = n\text{-C}_8\text{H}_{17}$ (Vincifos)

$\text{R} = \text{Me}$ (Diclorvos)

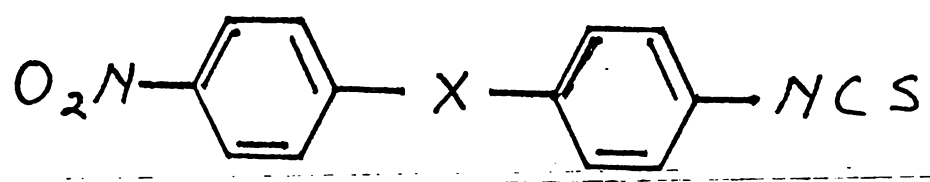
Haloxon se ha utilizado para el tratamiento de Ascariasis en ganado y es ciertamente uno de los más efectivos agentes antihelmínticos. (81)



Existen algunos otros compuestos de amplio espectro utilizados para el control de céstodos y nemátodos en perros y gatos.

II.3.20.- Isotiocianatos.

El Bitoscanato: 1,4fenilendi-isotiocianato, es un fármaco que muestra grandes propiedades antihelmínticas contra nematos y céstodos. Otro aril isotiocianato que tiene amplio espectro es el Nitrosscanato, el cual está muy relacionado con el esquistosomicida: 4-isotiocianato-4'-nitro difenil amina, es muy usado en perros contra céstodos y nemátodos, pero tiene un índice terapéutico bajo. (82, 83)



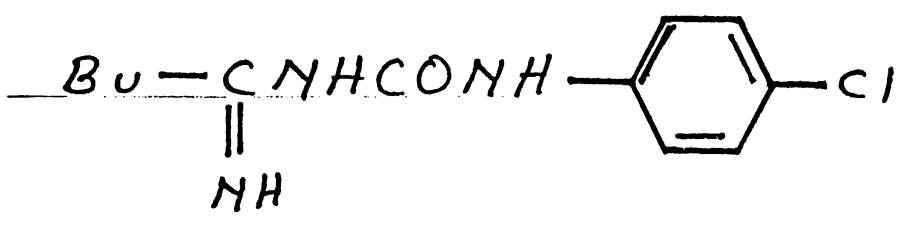
X = O Nitrosscanato

X = NH Amoscanato

Los fármacos anteriormente mencionados más el derivado de difenil amina Amoscanato son efectivos contra Ancylostoma duodenale y Necator americanus.

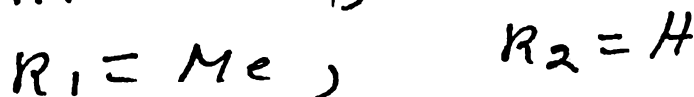
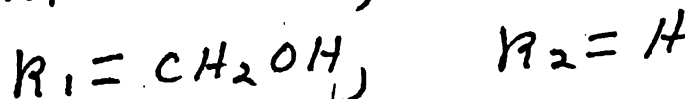
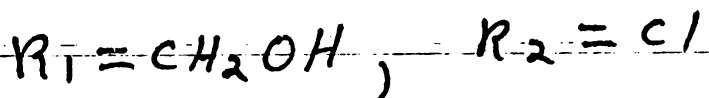
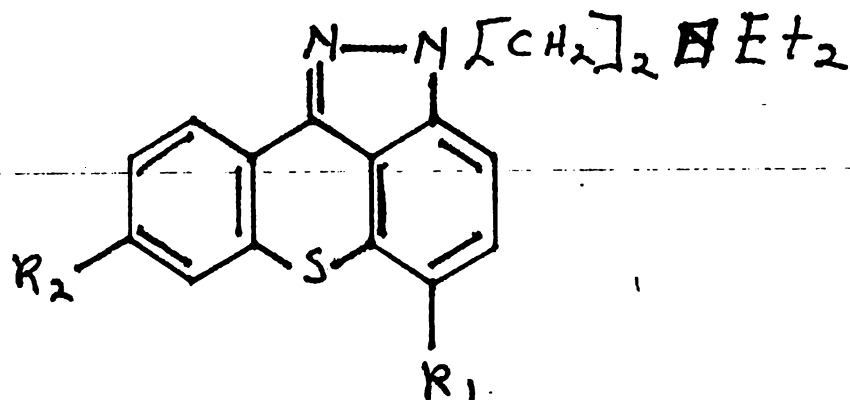
II.3.21.- Imidoilureas.

Potente actividad antihelmíntica fue descubierta en una serie de imidoilureas, de las cuales el análogo más activo parece ser el Carbantel: 1-(p-cloro fenil)-3-pentaimidoilurea, que es activo en perros contra nemátodos principalmente. (84)



Carbantel

Este grupo de compuestos fue estudiado como parte del programa de investigaciones de las propiedades adversas o tóxicas de la Hycantona, los cuales pueden disociarse de su buena actividad anti-esquistosoma por lo que fue preparada una serie de Benzotiopirano (4,3,2-cd) indazoles en los laboratorios Parke, Davis. (85)

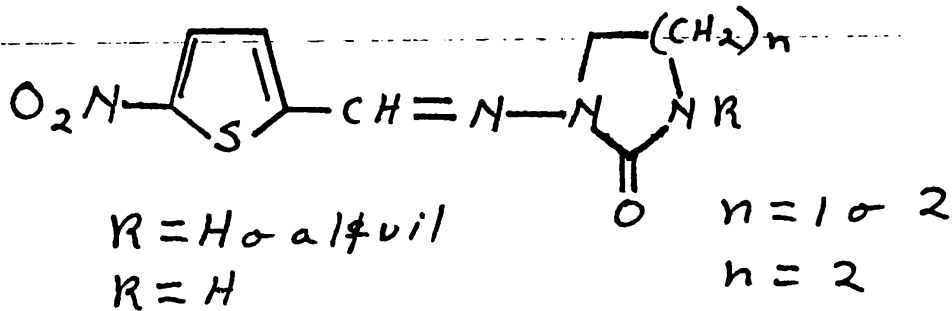


Estos compuestos tienen una potencia similar a la Hycantona contra *S. mansoni* en ratones por vía oral y por vía intramuscular en una sola dosis en hamster y ratones, aunque su toxicidad es menor, ellos intercalan bien en el ADN y por lo tanto retienen su actividad sustancial mutagénica y además cruzan en cepas resistentes a la Hycantona. (86)

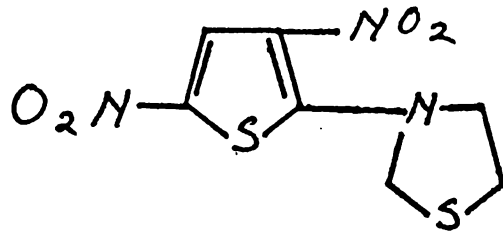
La preparación de N-óxidos, en el grupo amino terminal de la cadena lateral de los benzotiazepinoindazoles, ofrece derivados con mayor actividad anti-esquistosomas que la Hycantona por administración oral e intramuscular y con reducido potencial mutagénico, lo cual convierte a estos compuestos en una

II.3.23.- Nitrotiofenos.

Moderada actividad ha sido observada contra esquistosoma en ciertos nitrotiofenos. El más activo parece ser el 1-((5-nitro-2-tienilideno) amino) tetrahidro-2-(1H) pirimidinona, lo más relevante es que estos compuestos demostraron ser más potentes que los nitrofuranos. (88)



Reportes de los laboratorios Hoffman La Roche han indicado que el 3-(3,5-dinitro-2-tienil)-tiazolidina, es más activo que el Niridazol y además parece tener poca toxicidad en ratas, perros y monos. (89)



3-(3,5-dinitro-2-tienil) tiazolidina

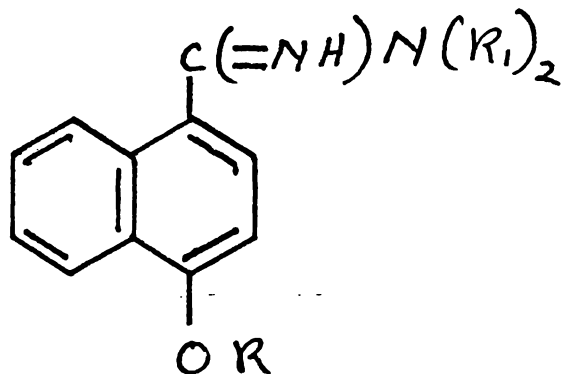
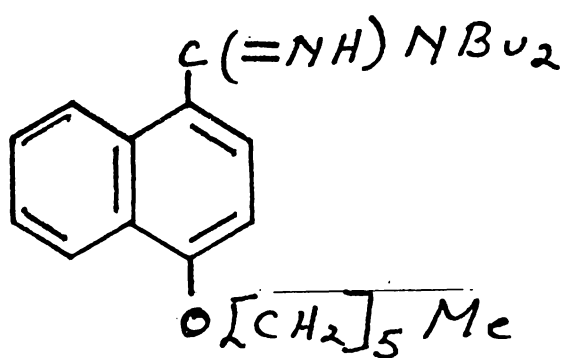
II.3.24.- Ditio carbamato.

Es un compuesto que es efectivo contra diferentes especies de Tremátodos: Clonorchis sinensis y Opisthorchis spp., es de los pocos que poseen pronunciada actividad contra estas especies en animales experimentales. (90)

II.3.25.- Naftamidinas.

El desarrollo de Bunamidina como taenicida veterinario - para uso en perros, borregos y aves fue la culminación de una investigación dentro de la síntesis de una variedad de naftamidinas en los laboratorios Wellcome Research. (91)

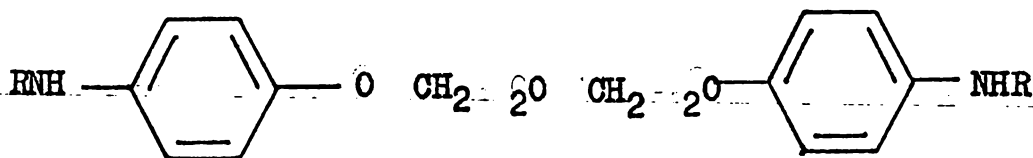
En una detallada evolución de las amidinas en gatos y - perros, la máxima actividad parece residir en los compuestos donde R contiene al menos cuatro átomos de carbono y R₁ consiste en no más de cuatro átomos de carbono aunque este patrón de actividad difiere marcadamente del observado en los primeros ensayos con ratones.



Bunamidina

II.3.26.- Fenoxialcanos.

La "Dianfenetida" es el resultado de una investigación sistémica en los laboratorios Wellcome Research para encontrar un fasciolicida efectivo contra los gusanos inmaduros usando como bioensayo el sistema de Fasciola gigantica en ratón.



Dianfenetida

R = Me CO

R = H

Los resultados permiten la introducción de dianfenetida a la medicina veterinaria y las relaciones estructura-actividad de esta serie de compuestos ha sido revisada por Hon- faniat. (93)

Se encontró que el producto es activo contra los gusanos en todos los estadios, hasta los 6 semanas de edad. (94)

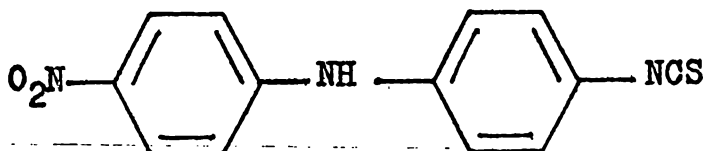
Entre el compuesto de etil lo es efectivo contra F. gigantica y F. hepatica, dianfenetida tiene actividad contra los gusanos, -

además es menos efectivo en bovinos e inactivo en conejos, parece ser, que esto se debe a la facilidad de metabolismo de dicho fármaco. (95)

II.3.27- Derivados del Nitrobeneno.

Un esquistosomicida recientemente descrito por Striebel es el 4-isotiocianato-4'-nitrodifenilamina (Amoscanto). Este compuesto parece ser bien tolerado en estudios de toxicidad aguda en una variedad de especies y es igualmente activo a una sola dosis contra las tres especies de esquistosomas. (96)

Hay que agregar que la actividad de este fármaco aumenta mucho cuando el tamaño de partícula ha sido reducido a 0.5 μ m, lo cual es impráctico desde el punto de vista comercial.

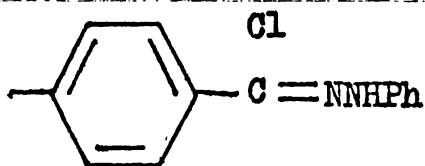


Amoscanto

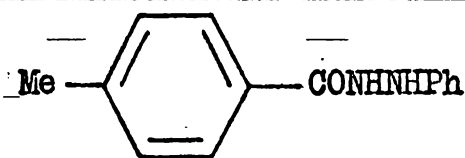
El fármaco ha demostrado no presentar actividad mutagénica en varios sistemas bacterianos a diferencia de Niridazol, Hycanona y los nitrofuranos. Además, parece ser activo también contra nemátodos tanto intestinales como de tejidos, en particular Necator americanus y Ancylostoma duodenale. (97)

II.3.28- p-Toluil fenil hidrazonas.

Un antihelmántico interesante, surge a partir de nuevos experimentos de los laboratorios Upjohn, este es la p-toluil-clorofenilhidrazon. Este compuesto parece ser activo contra un amplio rango de nemátodos y cístodos gastrointestinales adultos e inmaduros en bovinos. La acción metabólica principal del principal metabolito es la fenilhidrazon del ácido p-toluico, tiene la función de inhibir el crecimiento de los helmánticos. (98, 99)



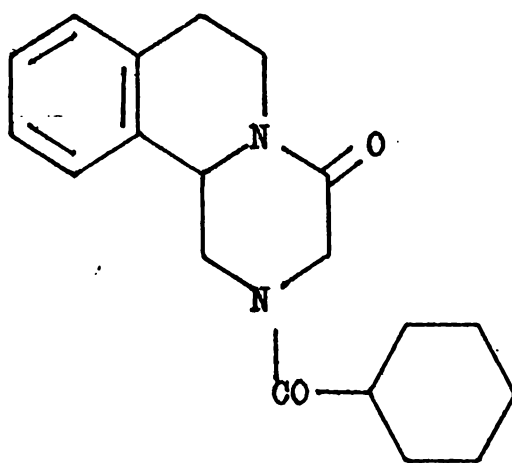
toluil-cloro-fenilhidrazona



Fenilhidrazida del ácido p-toluoico

II.3.29.- Prazicuantel.

Además de ser un taenicida veterinario, parece ser que es un potente esquistosomicida, de acuerdo a los recientes reportes de los laboratorios Bayer y Merck este fármaco es efectivo contra las tres especies de esquistosomas humanos, en una sola dosis de 20 mg/kg. (100)



Prazicuantel

- 2 -

II.4.- Justificación.

En reportes de la literatura se ha encontrado que los isoxazoles poseen diversas actividades biológicas, y basándose en estas, H.G. Sen y col., sintetizaron el 4-bromo metil-3-(cloro fenil) isoxazol, el cual fue probado contra Oxiuros (Syphacia obvelata y Aspicularis tetraptera) Nematospiroides dubius e Himenolepis nana en ratón, exhibiendo actividad contra H. nana cuando fue administrado oralmente. Esto motivó la preparación de 14 análogos de este compuesto, los cuales fueron examinados para observar su actividad antihelmíntica.

Ellos encontraron que de los 14 análogos, el 5-bromometil-3-(4-cloro fenil) Isoxazol fue el más activo a una dosis de 300 mg/kg/día durante 3 días sucesivos contra H. nana puesto que ningún gusano, ni sus escolices aparecieron en la necropsia. En una sola dosis la cura absoluta fue obtenida a 800mg/kg.

Sin embargo los compuestos estudiados fueron inactivos contra N. dubius y oxiuridos en ratón a 300 mg/kg o dosis más altas.

Los resultados fueron comparados contra N-(2-cloro-4-nitrofenil)-5-cloro salicilamida, la cual causa el 100% de depuración a 150 mg/kg/día por tres días y en una sola dosis a 400 mg/kg.

Por lo tanto, la actividad del 5-bromometil-3-(4-clorofenil) Isoxazol contra H. nana indica que los homólogos de este compuesto pueden ser usados como agentes cestodocidas.

Posteriormente se probaron series del 5-amino y 5-acilamino-3-piridinil-isoxazoles como nematocidas, además ha sido observada actividad coccidiostática y promoción del crecimiento para los 5-amino-4-(5-nitro-2-furil)-4-(carbonil) Isoxazoles (101).

Con estas referencias acerca de los isoxazoles John B. Carr. y col., decidieron investigar los 5-fenilisoaxazoles como antihelmínticos, los cuales demostraron actividad siempre

y cuando un halogeno estuviera como sustituyente en la posición 3 del anillo del Isoxazol, lo cual permitió durante el estudio observar la actividad del 5-cloro-3-fenilisoxazol que es isomero de uno de los compuestos propuestos en la serie inicial, encontrando que posee la misma actividad, lo cual provocó la extensión del estudio a la serie de los 3-fenil-isoxazoles en la cual la actividad antihelmíntica se mantiene aunque se sustituye el halogeno en la posición 5 por ciertos grupos alcoxi, tioalcoxi o amino. (102)

Los 3-halo-5-fenil- y 3-fenil-5-halo-Isoxazoles mostraron actividad antihelmíntica en un rango de dosis de 16 a 500 mg/kg oralmente contra Nippostrongylus braziliensis en ratas albinas. En la primera serie solo presentaron actividad el 3-cloro, el 3-bromo y el 3,4-dicloro, así como el 4-clorofenil y el 2,4-diclorofenil que fueron menos activos.

En la segunda serie fueron más activos el 5-cloro y 5-bromo y ligeramente menos activos los siguientes derivados: 5-metoxi, 5-etoxi y 5-metiltio. El 5 etiltio, 5-(4-penteniloxi) y 5-dimetilamino, fueron significativamente menos activos. La oxidación del azufre en el derivado metiltio dando el sulfóxido y la sulfona tiene como resultado pérdida de la actividad.

Revisando esto se puede concluir que se requieren sustituyentes electronegativos que tengan la capacidad de atraer electrones en las posiciones 3 y 5 del Isoxazol para poder tener actividad antihelmíntica así como también podrían ser grupos lipofílicos de tipo aromático en posiciones 3 y 5, los cuales a su vez podrían ser sustituidos por grupos electronegativos con lo cual podría obtenerse probablemente mayor o igual actividad biológica.

Desde entonces hasta la fecha no hay reportes de este tipo de compuestos; por lo cual consideramos importante continuar con el estudio de esta familia.

Los Isoxazoles son únicos en su comportamiento químico entre los compuestos heterocíclicos en general y entre los azoles relacionados en particular, ya que el isoxazol posee propiedades típicas de un sistema aromático junto con una alta labilidad del anillo bajo ciertas condiciones, particularmente en la unión Nitrógeno-Oxígeno. (103)

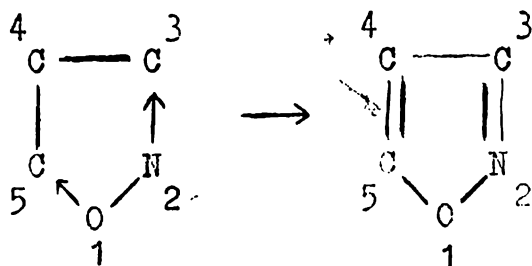
Desde un punto de vista formal, el Isoxazol puede ser considerado como un análogo de la Piridina, tal analogía formal se debe a que Isoxazol se asemeja a Piridina más que otros compuestos heterocíclicos. Difiere de la Piridina en que sufre reacciones de sustitución electrofílica y posee un anillo más labil.

Aunque los derivados del Isoxazol han sido conocidos por más de 100 años, la investigación de su química ha sido desarrollada lentamente. Los primeros estudios fueron principalmente enfocados al desarrollo de métodos sintéticos. Solo recientemente la atención fue enfocada sobre la investigación de las propiedades químicas y en particular de las peculiaridades del comportamiento de los derivados del Isoxazol y la elucidación de sus características fisicoquímicas. (104)

II.5.1.- Síntesis de Derivados del Isoxazol.

Para la preparación de compuestos con el sistema Isoxazol, dos rutas sintéticas son de gran importancia:

1a.- Condensación de las uniones 1 → 5 y 2 → 3 del anillo del Isoxazol.



Ninguna nueva ruta sintética ha sido sugerida reciente -
mente. (105, 106)

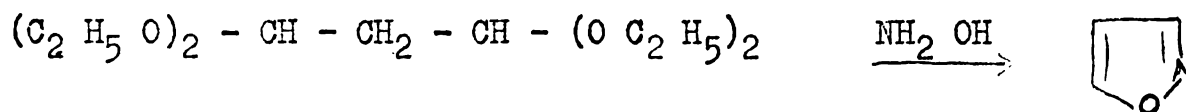
II.5.1.1.- Síntesis de Isoxazoles que involucran formación de las uniones 1→5 y 2→3 del anillo del Isoxazol.

Estos son sintetizados por un método extensamente conocido y elaborado, por condensación de β-dicetonas o sus derivados con hidroxilamina.

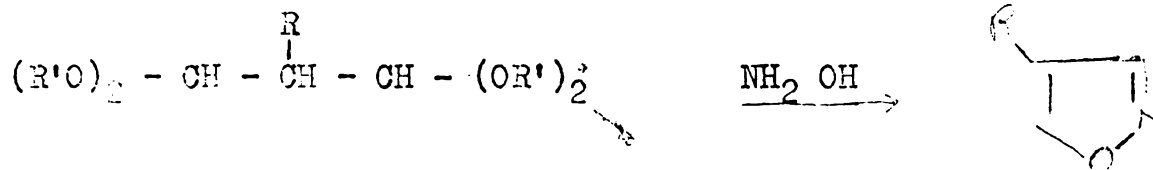
1,1,3,3,tetra alcoxiopropanos + Hidroxil amina. →

→ Isoxazol.

Condensación de estos derivados con hidroxilamina ha hecho posible la síntesis del Isoxazol sin sustituciones.

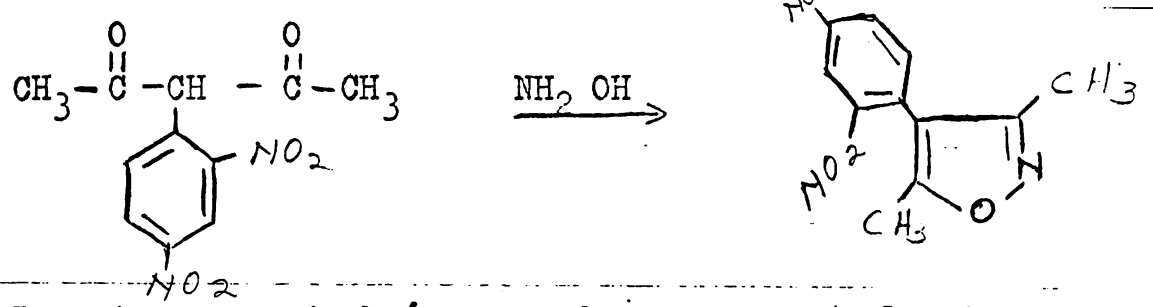


Este tipo de reacción usando homólogos del tetra alcoxi-propano, hace posible obtener 4 alquilisoxazoles.

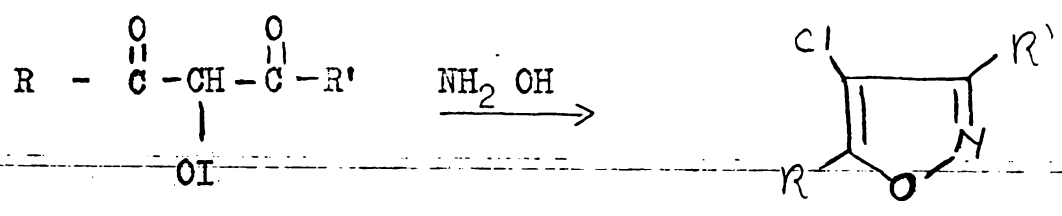


Meso - sustituidas β - dicetonas han sido utilizadas para sintetizar isoxazoles 3,5-disustituídos, con algunos grupos reactivos en la posición 4. (107)

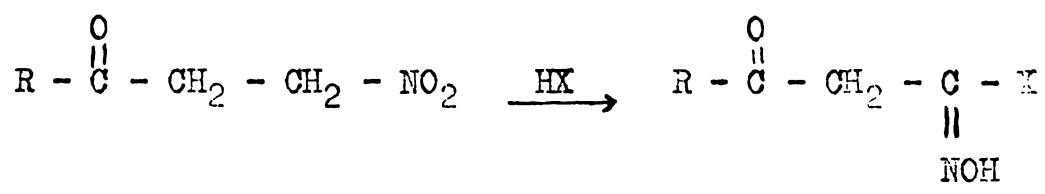
Por ejemplo 3,5-dimetil-4-(2,4 -dinitrofenil) Isoxazol.



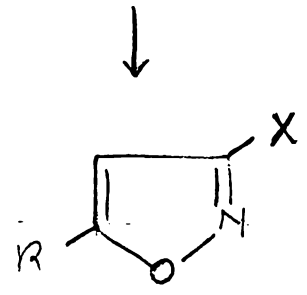
De esta manera también se pueden preparar 4-cloroisoxazoles sustituidos en las posiciones 3 y 5 por grupos alquilo, arilos y otros grupos funcionales. (108)



Un caso particular de la síntesis de Isoxazoles vía dicetonas es la preparación de 3-halogenoisoxazoles a partir de β - nitrocetonas tratadas con haluros de hidrogeno. (109)



Esta interesante transformación aunque no se aísla el intermediario, produce y se obtiene el derivado correspondiente.



Existen muchos artículos publicados acerca de la síntesis de isoxazoles mono y disustituídos a partir de β -cetoaldehidos y sus derivados.

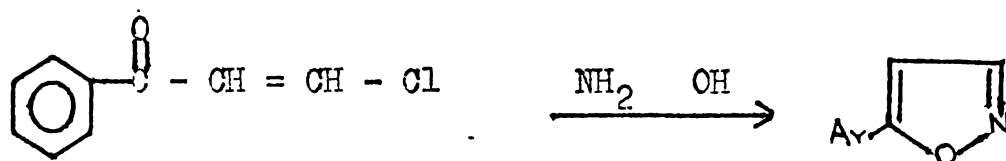
Sin embargo la reacción de β -cetoaldehidos e hidroxil...

na presenta una ambigüedad ya que de ella resulta una mezcla de isoxazoles 3 y 5 monosustituídos, y esto disminuye considerablemente el valor preparativo del método, especialmente aquellos de sus formas enólicas (β -sustituídas).

El uso de β -cloro vinilcetonas en la reacción con hidroxilamina representa una mayor utilidad como método preparativo para sintetizar monoalquil isoxazoles. Esto se debe a que el ataque de la hidroxilamina es en ambos átomos, el carbonilo y el carbono. En algunos casos la reacción puede ser dirigida hacia la formación de un isómero. (110)

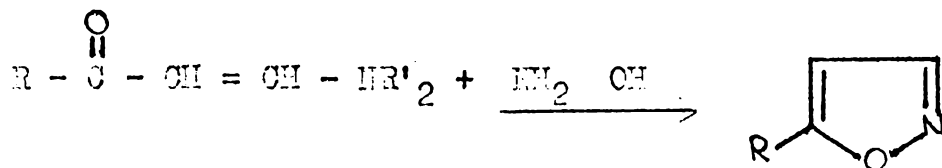
Esto es, la reacción de α -Cloro alquil- β -clorovinilcetonas con hidroxilamina, demuestra el efecto del átomo de cloro, dando cloro alquil isoxazoles con 90-95% del isómero sustituido en la posición 3.

Es interesante notar que las aril- α -cloro vinilcetonas (con varios sustituyentes en el anillo aromático) reaccionan con hidroxilamina para dar solo 5-aril isoxazoles.



Los estudios de reactividad de las vinilcetonas β sustituidas, $\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}=\text{CH}-\text{X}$, mostraron que la electrofilia del grupo carbonilo decrece de las clorovinilcetonas ($\text{X} = \text{halogeno}$) a las ariloxivinilcetonas ($\text{X} = \text{O Ar}$) y particularmente β -dialquilamino vinilcetonas ($\text{X} = \text{N R}_2$). La reacción con hidroxilamina es acompañada por la consiguiente sustitución nucleofílica del grupo X por hidroxilamina lo cual incrementa el porcentaje del isómero 5-sustituido.

La reacción con alquil y aril-dialquilamino vinilcetonas da casi exclusivamente el isoxazol sustituido en la posición 5, este método es de valor preparativo. (111)

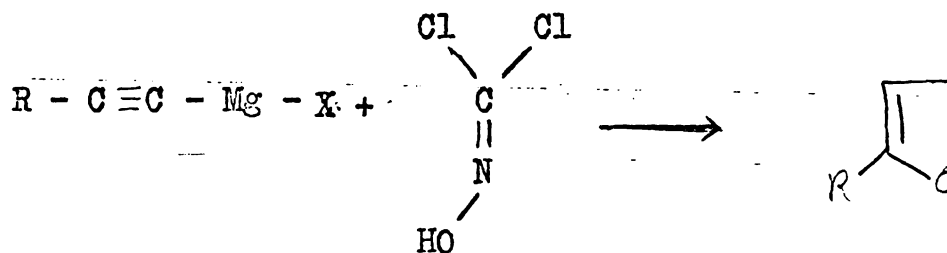


Este grupo de síntesis ha venido incrementándose desde am-
bos puntos de vista, práctico y teórico, ya que hace posible una
gran variedad de derivados del isoxazol. Incluye la formación de
anillos de isoxazol y Δ^2 isoxazolina a partir de compuestos in-
saturados y cloruros del ácido hidroxílico o sus correspondien-
tes óxidos de nitrilo.

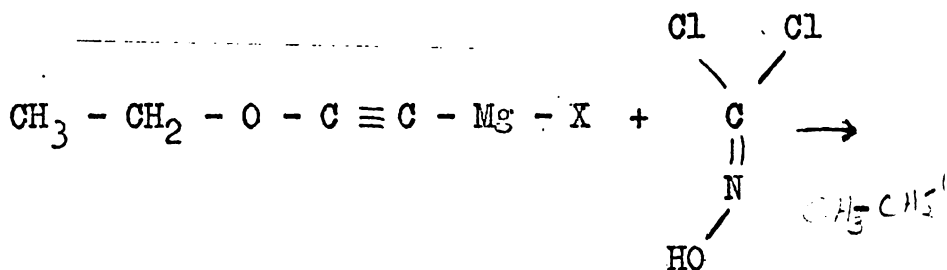
La primera síntesis de un 3,5 di alil isoxazol a partir del
cloruro del ácido arilhidroxílico y éter de alil, fue
efectuado por Meynard y Bauer en 1927. Continuó en 1946,
cuando Gillice y Spamer se ocuparon que los cloruros de ácido
del ácido hidroxílico, bajo tratamiento con alcohol de nitrilo
de nitrilo, producen isoxazoles y especialmente Δ^2 isoxazolin
han sido preparados. (114, 115)

te un enolato sodico de una β -dicetona. Los óxidos lo condensan directamente con compuestos insaturados.

Se pueden preparar 3 cloro isoxazoles a partir de ormozima. (116)



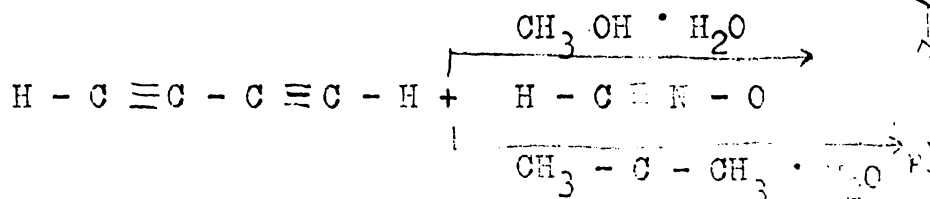
También 5 etoxisoxazoles a partir de etoxiacetileno

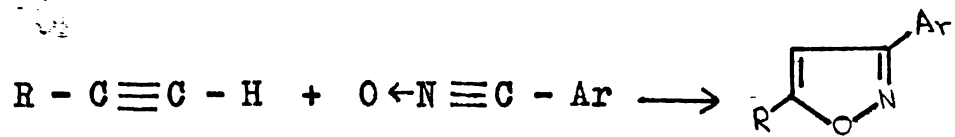


La mayor atención esta presente en la 2a. varian al forma uniones 1- 5 y 3- 4, por una reacción de a óxidos de nitrilo a múltiples uniones.

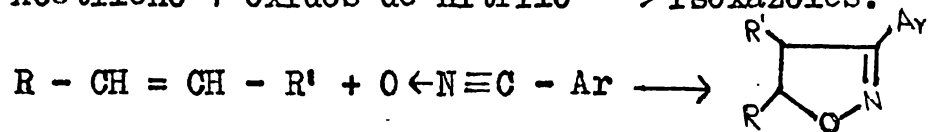
El caso más simple se presenta en la "síntesis nica".

Cramer reporta la síntesis de 3,3' di-isoxazolil 70% de rendimiento a partir de acetileno y óxidos de nitrilo y la síntesis de una mezcla de 5,5'-di-isoxazolil a partir del ácido fulminico y diacetileno. (117)



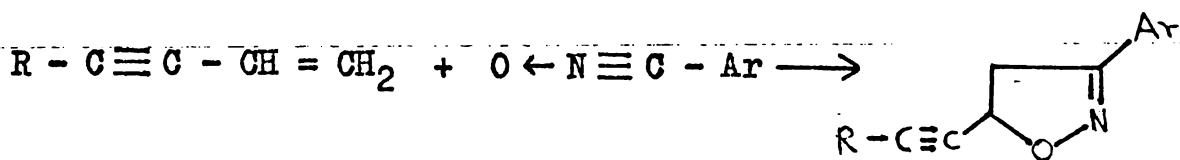


Acetileno + óxidos de nitrilo \longrightarrow Isoxazoles.



Olefinas + óxidos de nitrilo \longrightarrow Isoxazoles. Δ^2

En esta síntesis la doble ligadura presenta mayor reactividad que la triple ligadura, utilizando vinil acetilenos se forman 5 etinil oxazolinas en mayor proporción que los viniliso-xazoles. (118)



II.5.2.- La estructura y propiedades fisicoquímicas de Derivados del Isoxazol.

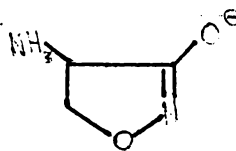
La sustitución en la posición 5 tiene mayor interacción con el núcleo del isoxazol que los sustituyentes en la posición 3.

La conjugación es más pronunciada para grupos fenilo que para grupos metilo.

El núcleo de isoxazol es un donador débil de electrones, esta propiedad decrece en los átomos de carbono del anillo en el siguiente orden $C4 > C5 \approx C3$. (119)

II.5.3.- Actividad Biológica de derivados del Isoxazol.

Biologicamente, el compuesto más importante de esta serie que se ha probado ser un antibiótico antituberculosis es la ciclo-serina ó 4-amino isoxazolidin-3-ona.



También algunos ácidos hidroxámicos del isoxazol han demostrado actividad antituberculosa. (120)

Derivados del isoxazol combinados con penicilinas, sulfo-

61
namidas y 4-hidroximinoisoxazol-5-onas, poseen actividad antibacteriana. (121)

También involucran sustancias con poder analgésico o como anestésicos locales, aunque no han tenido una aplicación amplia.

Las hidrazidas de los ácidos carboxílicos del isoxazol son de gran interés. Por ejemplo la hidrazida del ácido 5 metiliso - xazol-3-carboxílico tiene una alta actividad antileprosa y la correspondiente benzil hidrazida es un fuerte inhibidor de la monoaminooxidasa, ésta también se usa en sicoterapia y en el tratamiento de angina de pecho. (122-124)

Además se sabe que algunos derivados del 3-aryl-5-aminoisoxazol con sustituyentes fenilos, furilos y tienilos, así como 3-metil-5-piridin isoxazoles presentan actividad hipoglucemiante. (125 y 126)

También los nitrofuril isoxazoles puede tener actividad antimicrobiana incluyendo propiedades antibacterianas, antifungicas, antivirales, antihelmínticas, coccidiostaticas, etc. (127)

Debido a lo anteriormente expuesto, decidimos utilizar la ruta sintética que comprende la condensación de las uniones 1-5 y 2-3 del anillo del Isoxazol, partiendo de dicetonas e hidroxilamina, ya que es un método de valor preparativo comprobado. (105 y 106)

II.6.- Pruebas Biológicas.-

62

Antes de que un nuevo compuesto pueda ser empleado en la terapéutica tiene que estudiarse desde el punto de vista farmacológico, para poder saber si el compuesto tiene propiedades curativas o alivia algún síntoma, sin producir daño al ser vivo que lo recibe. Lo primero es la demostración de la efectividad del fármaco y lo segundo la seguridad que éste pueda ofrecer.

El desarrollo de un nuevo medicamento incluye las necesidades científicas y los requisitos legislativos que debe tener un fármaco para ser prescrito.

En el esquema del desarrollo de un fármaco, una vez que se ha sintetizado una molécula o aislado un nuevo principio activo de un producto natural, se requiere probar los efectos de esta sustancia en un ser vivo, esto se lleva a cabo en animales antes de hacerlo en humanos, para prevenir en lo posible la aparición de reacciones adversas en éstos últimos. Todos los estudios se efectúan en animales o en preparaciones in vitro, antes que el fármaco se aplique a un ser humano, se llaman estudios de farmacología preclínica o experimental a diferencia de los que se efectúan en seres humanos, que se llaman de farmacología clínica. (128)

En los estudios de farmacología preclínica, lo primero que se busca es la determinación de la efectividad del fármaco o sea de las acciones farmacológicas especialmente las que podrían ser terapéuticas, para así no administrar un compuesto ineficaz. Estos estudios que se efectúan en animales para hacer patentes los efectos farmacológicos o terapéuticos se llaman estudios de eficacia y se realizan ya sea en el animal vivo completo, o en órganos o tejidos aislados in vitro, o inclusive en organelos subcelulares.

Algunos farmacólogos llaman a estos estudios, cernimiento de la actividad del fármaco y con ellos se pretende obtener un perfil de las acciones farmacológicas de él. (129)

No es suficiente demostrar que un medicamento es efectivo en animales, sino que también es necesario demostrar que su administración no producirá efectos nocivos y esto se hace mediante

te los estudios de seguridad o toxicología, los cuales pretenden detectar algún efecto tóxico en los animales y evaluarlo para poder predecir la probabilidad de su aparición cuando el medicamento sea aplicado, y así, prevenir la manifestación de los efectos colaterales o secundarios indeseables e incluso la muerte.

Estos estudios también proporcionan conocimiento sobre las acciones farmacológicas e inclusive orientan sobre los mecanismos de acción, ya que muchos efectos tóxicos son extensión de los efectos farmacológicos del medicamento.

Con los resultados de efectividad y toxicología en animales también se estiman las dosis que probablemente sean bien toleradas en el hombre. (130, 131)

Toxicidad Aguda

Toxicidad a largo plazo { T. subaguda.
T. crónica.

Teratogénesis Química.

Carcinogénesis Química.

Mutagénesis Química.

Estudios Especiales.

II.6.1.- Especies Animales Utilizadas.

La mayoría de los estudios toxicológicos se efectúan en más de una especie animal porque la disposición de un medicamento o sea su absorción, distribución, excreción y principalmente su metabolismo puede no ser igual en el hombre e incluso varía de una especie animal a otra.

Muchos efectos de los tóxicos en los animales no se pueden observar en algunos animales, aunque se presentan en otros. Por ejemplo, si un fármaco produce vómito, este fenómeno no podrá ser observado en ratón, rata o conejo, porque estos animales no vomitan, a diferencia del perro o el gato que sí presentan este fenó-



meno.

E 4

Además no solo existen diferencias entre las especies, sino también se llegan a presentar diferencias entre distintas cepas de una misma especie.

Por lo tanto para realizar los estudios de seguridad o toxicología se emplean de 3 a 4 especies animales, procurando que no todas sean roedores y que incluyan un carnívoro. Los animales más frecuentemente usados son: rata, ratón, perro, conejo, mono y cerdo.

La especie no roedora más utilizada es quizá el perro Beagle, aunque el metabolismo de los fármacos en esta especie se desvía mucho del metabolismo del hombre.

Hay que tomar en cuenta que entre las especies empleadas deben incluirse a aquellas en las que se encontraron los efectos farmacológicos del medicamento y en las que se calcularon las dosis efectivas medias de eficacia, si es posible.

De las especies seleccionadas deben estar representados ambos sexos y diferentes edades ya que existen muchas diferencias en absorción, distribución, biotransformación, excreción y sensibilidad particular a un medicamento, dependiendo de la edad.

Se deben seleccionar grupos de animales control en los cuales se administre solamente el vehículo del medicamento, por las mismas vías, siguiendo es esquema de administración y volumen del medicamento por probar. (132)

II.6.2.- Estudios de eficacia.

65

Este tipo de estudios es muy variado y dependerá de la actividad biológica que se busque y de las propiedades fisicoquímicas de el o los compuestos por probar.

Para realizar la estimación cualitativa y cuantitativa de la acción farmacológica, el efecto deseado debe estar bien definido y es necesario un procedimiento que pueda determinar si un fármaco en particular tiene o no un efecto especificado. Y si lo tiene, es necesario un método cuantitativo para estimar su potencia y la selectividad de su acción.

En la estimación cualitativa, se lleva a cabo una selección farmacológica por medio de procedimientos "in vitro" o "in vivo", en los últimos se emplean animales de laboratorio. En general se administran varias dosis hasta alcanzar la "dosis máxima tolerada" ya que se desconoce por completo la dosificación. El problema, entonces, es determinar si los efectos terapéuticos deseados se obtienen o no a dosis atóxicas, pero inicialmente se debe escoger el procedimiento a seguir y el criterio para medir la efectividad del fármaco, así como si dicha efectividad va ha ser comparada contra un fármaco conocido o una sustancia patrón.

Cuando un nuevo compuesto o grupo de compuestos no tiene establecido un criterio específico para acciones deseadas en particular, entonces se someten a un proceso que se conoce como "selección ciega", en donde el objetivo es determinar si tienen alguna actividad farmacológica útil, por medio de aquellas pruebas que se tengan montadas y estandarizadas, para no dificultar el manejo y elevar los costos de la investigación.

Dentro de las pruebas "in vitro" más conocidas se encuentran las determinaciones de la actividad antibacteriana y antimicótica, ya que estos microorganismos se pueden cultivar "in vitro".- Por otra parte existen los bioensayos con tejidos aislados como los que se realizan para determinar la actividad oxitóica utilizando útero de rata, etc.

En lo que se refiere a las pruebas "in vivo" la variedad y la complejidad imposibilita su enumeración aunque podemos mencionar a las más utilizadas, como son las pruebas selectivas sobre

66
el sistema nervioso central, etc.

La estimación cuantitativa o biovaloración es un procedimiento para determinar las relaciones cuantitativas entre la dosis o concentraciones de un fármaco y la magnitud de la respuesta biológica que provoca, o sea determinar la potencia de un fármaco.

La biovaloración también sirve para estandarizar las preparaciones de fármacos impuros, como guía en la producción comercial de medicamentos.

Para realizar la estimación cuantitativa se pueden emplear tres enfoques distintos:

a) Medir la dosis umbral para obtener una respuesta biológica final específica. En este caso lo que se valora no es la acción farmacológica sino un efecto tóxico relacionado con dicha actividad. Por ejemplo la evaluación de un estándar de polvo de digital.

b) Medir una respuesta biológica graduada, a varias dosis y la potencia del fármaco desconocido se compara con la de una preparación estándar del mismo o de otro fármaco. Por ejemplo la evaluación de antihistamínicos comparando a los nuevos fármacos con un estándar de la difenilhidramina (un agente antihistamínico conocido).

c) Medir y registrar una respuesta cuántica y el porcentaje de efectos positivos de cada dosis. El fármaco desconocido se compara entonces con un estándar en relación a la potencia para producir el efecto cuántico. La aplicación más común de este punto de vista, son las pruebas de toxicidad, por ejemplo determinaciones de la dosis letal cincuenta (DL 50).

En el caso particular de los estudios de eficacia de un nuevo fármaco, general se utiliza el segundo enfoque, midiendo una respuesta biológica graduada, aunque por la extensión de la selección, es difícil formular criterios para terminar un programa de selección.

Si se encuentra un nuevo fármaco. ¿Se deben realizar modificaciones moleculares buscando incrementar la actividad y disminuir la toxicidad? Si no se encuentra ningún compuesto prometedor ¿Qué tanto se debe continuar la investigación? (133)

II.6.3.- Estudios de Toxicidad.

II.6.3.1.- Toxicidad Aguda.

Estos estudios tienen por objeto descubrir los efectos tóxicos ocasionados por una sola administración del medicamento o por dosis sucesivas administradas en un período corto de tiempo?

Se determina la aparición de síntomas en el animal y el rango de dosis letales, particularmente de la dosis letal media (DL50) por medio de la observación constante, posterior a la administración.

Se deben emplear cuando menos tres especies animales, cuidando que una de ellas no sea roedora y recordando incluir la o las especies que se emplearon para calcular la dosis efectiva media, así como aquellas que se pretendan usar en estudios especiales del fármaco en cuestión. Además hay que considerar la edad de los animales para incluir a jóvenes y viejos.

Por otra parte la administración del medicamento debe ser cuando menos por tres vías diferentes que incluyan aquellas que se pretendan utilizar en la terapéutica, que por lo general son: la vía oral, intramuscular e intravenosa y para medicamentos que se van a usar por vía tópica, cuando menos una de las vías debe ser sistémica, ya que se tiene que tomar en cuenta la aparición de síntomas tóxicos por la absorción percutánea.

La administración por vía intravenosa debe realizarse lentamente tratando de mantener la misma velocidad siempre ya que esto puede ser un factor importante en la determinación de la toxicidad.

Cuando se desconoce la dosis que puede producir la muerte, se pueden realizar estudios preliminares con pocos animales, administrando una dosis diferente, calculada logarítmica o geométricamente a cada grupo incrementando dicha dosis hasta obtener la muerte.

Una vez que se tiene idea de la dosis letal, se hace un diseño para el cálculo de la dosis letal media (DL50) para lo cual se pueden usar diferentes métodos. (134, 135)

Después de la administración, se efectúa una observación cuidadosa de los animales durante varias horas, registrando los síntomas que se presenten. Dicha observación proporciona datos muy importantes sobre los efectos farmacológicos y tóxicos del fármaco, por lo

68

que debe ser muy cuidadosa y tratar de realizarla siempre en las mismas condiciones.

En los animales muertos, es conveniente realizar la necropsia completa, con descripción macroscópica de los órganos al momento de removerlos, registrando su peso y sus medidas (hígado y riñón). Debe hacerse un estudio histopatológico de ellos. El número de muertos y el momento en el que ocurren debe registrarse. Si no se puede realizar la necropsia inmediatamente, se pueden abrir los animales en canal y colocarlos en formol.

Los animales sobrevivientes deben ser observados cuando menos por dos semanas, después sacrificar una muestra estadísticamente significativa y realizar la necropsia de ellos ya que podrían presentar daños en algunos órganos.

Los estudios de toxicidad aguda de un medicamento pretenden dar a conocer los efectos colaterales o indeseables, las dosis letales y la información acerca de la manera de producir la muerte.

II.6.3.2.- Toxicidad a largo plazo.-

La gran mayoría de los medicamentos no se administran en una sola ocasión, sino que se emplean por períodos más o menos prolongados, lo cual da margen a que muchos fenómenos que no aparecen con una sola administración puedan presentarse después de dosis sucesivas ya sea por acción prolongada del medicamento en el sitio de acción, por acumulación o modificación enzimática, por ejemplo: inducción enzimática, tolerancia, adicción, etc.

Para realizar estos estudios se emplean diferentes especies animales (las más usadas son rata, gato y perro), rutas de administración y dosis.

Las dosis se eligen de acuerdo a los resultados obtenidos en los estudios de toxicidad aguda y deben escogerse de tal forma que la más baja no produzca síntomas aparentes de toxicidad y la más alta produzca síntomas definidos de toxicidad.

Respecto a la duración se indica que debe estar relacionada con la duración del período de administración que se espera tenga el medicamento.

Período de administración

Período sugerido para realizar el estudio de toxicidad a largo plazo.

Dosis única o pocas

Mínimo dos semanas.

Hasta 4 semanas

13 - 26 semanas.

Más de 4 semanas

Mínimo de 26 semanas.

También se indica que dichos estudios se deben realizar cuando menos en dos especies de animales maduros, un roedor y no roedor y que de las tres dosis elegidas, la más alta debe producir efectos tóxicos con cambios hematológicos y bioquímicos o anatómicos, que a la vez permitan la sobrevivencia de la mayoría de los animales, debiendo aparecer algunos efectos farmacológicos y que la dosis más baja que se elija debe estar cerca de la (Dosis efectiva cincuenta) DL50 para esa especie sin causar reacciones adversas.

En Estados Unidos la FDA ha establecido su relación para la de terminación de toxicidad a largo plazo, al igual que en Europa donde han llegado a un acuerdo sobre los protocolos de farmacología preclínica y clínica. (136)

El diseño de los estudios de toxicidad prolongada depende mucho del tipo de fármaco y de la enfermedad o padecimiento para el cual va a ser usado, de las vías de administración y edad en las que se va a emplear, así como el método estadístico que se va a utilizar. (137, 138)

La frecuencia de administración se debe ajustar a la vida media del medicamento en las especies que se van a estudiar. Para esto se requiere hacer algunos estudios paralelos de farmacocinética. Cuando el medicamento se administra oralmente, se debe tomar en cuenta las modificaciones de absorción, para lo cual es necesario realizar estudios paralelos de biodisponibilidad.

Las condiciones fisiológicas de los animales de experimentación deben ser chequeados antes, durante y después de cada experimento. Generalmente este chequeo se realiza en forma periódica y puede ser cada 7 o 15 días en los períodos cortos de administración y cada mes

en los períodos más largos.

10

A todos los animales que mueren se les debe efectuar una necropsia completa y a los sobrevivientes se les debe sacrificar durante los tiempos indicados según el diseño del estudio y realizar en ellos la necropsia.

Debe registrarse la respuesta local de los tejidos en el sitio de la administración.

Hay que recordar que se debe contar con los grupos control a los cuales se esté administrando el vehículo del medicamento sin el principio activo.

También se deben conservar hasta el final algunos animales del grupo de dosis más alta y del grupo control para observar si las lesiones, en caso de existir estas, son reversibles o no. (135)

II.6.3.3.- Teratogénesis. Química.

Los estudios de teratogenicidad forman parte de los estudios sobre reproducción, los cuales son muy variados y abarcan desde estudiar el daño en los gametos masculino y femenino que pudieran resultar en esterilidad, hasta la producción de descendencia anormal:

- a) Estudios de espermatogénesis del perro Beagle.
- b) Efecto en la homeostasis uterina y en la nutrición del feto, por ejemplo; efectos del medicamento en la implantación y en la función placentaria.
- c) Efecto en la embriogénesis propiamente dicha.
- d) Efectos tóxicos en el feto, por ejemplo; el efecto de ceguera congénita que puede producir la quinina.
- e) Efectos en el metabolismo de la madre.
- f) Efectos en el trabajo de parto, por ejemplo; los antiinflamatorios, como la indometacina, aspirina y ácido fenclórico alteran el parto en las ratas por inercia uterina con muerte fetal.
- g) Efecto en la producción de leche y
- h) Efectos tardíos en la descendencia.

Hay que tomar en cuenta las diferencias en la fisiología placentaria de las especies en estudio. Habitualmente se deben usar dos especies animales una de las cuales no debe ser roedora, por ejemplo, ratas y conejos. Aunque en ciertos casos es necesario incluir una tercera especie. Normalmente se utilizan tres dosis: la más alta debe producir alguna evidencia de toxicidad materna y las vías deben incluir las rutas de administración propuestas para administración clínica.

Existen diferentes diseños para realizar estos estudios, el más empleado es el de la F.D.A. en el cual se trata a los machos 60 días antes de la cruce y a las hembras 24 días, continuando el tratamiento durante la cruce, la gestación y la lactancia.

Debe existir un grupo control y dos grupos tratados, cada uno con 10 machos y 20 hembras. Para detectar efectos tempranos se sacrifican y examinan 10 hembras por grupo a los 14 días de la gestación y a las 10 hembras restantes se les permite criar a la descendencia por 21 días para detectar efectos al finalizar la gestación y durante la lactancia.

En algunos casos siguiendo la observación de las crías hasta la madurez para examinar su conducta y asegurar que estos animales se reproduzcan normalmente.

Hay estudios peri y post-natales que requieren tratamiento estadístico especial. (140)

II.6.3.4.- Carcinogénesis y Mutagénesis química.

Muchas sustancias químicas son capaces de producir cancer, por lo tanto es conveniente poder detectar este efecto antes de que el medicamento sea administrado.

El comité Dunlop de Inglaterra recomienda un diseño en el cual se administre el compuesto durante un año a un grupo de animales, comparando después la frecuencia de la aparición de tumores en una población, contra otra población control que se hubiese mantenido en las mismas condiciones durante el mismo período de tiempo.

Las más comunes son en las que se producen desarrollo como desenlace, para lo cual se utiliza la técnica de Ames en la que se emplean ratas hembras jóvenes de la cepa Wistar-Ky, en las cuales el tejido glandular mamario es sensible a la administración intragástrica de una dosis alta de carcinógenos y desarrollan carcinoma mamario en un período de meses.

Entre las pruebas que no se basan en la producción de tumores la prueba de reducción del tetrasolium y la técnica propuesta por Ames y col., la cual es la más utilizada y conocida para la producción de mutagénesis "in vitro" en Salmonella typhimurium por medicamentos. Existen otras pruebas de mutagenicidad como Neurospora crassa y cultivos de células animales. La prueba de Ames tiene las ventajas de la prueba de Ames.

La organización mundial de la salud recomiendan que para la evaluación de carcinogenicidad, el período de administración de medicamento no sea menor de dos años para ratas y hamsters para el ratón, e inclusive períodos tan largos como se han sido recomendados para el perro observándose la aparición de tumores en la vejiga urinaria. (141)

5.- Estudios. Especiales.

Estos estudios se realizan para obtener efectos de tumores o aparatos específicos y dependen del tipo de vía de administración y de los órganos o regiones que son afectadas por él, por ejemplo, cuando se emplean animales para administrar un medicamento, es necesario hacer pruebas en mucosas e inclusive a nivel de epitelio y de glándulas. Además muchas de éstas son útiles también para

gunas pruebas en las que se coloca al animal o la cabeza de - -
éste en cilindros cerrados en donde se dispersa la sustancia por
estudiar, haciendo estudios clínicos e histopatológicos de las -
mucosas deseadas. (142)

La FDA ha publicado guías para algunos de estos estudios y
en caso de combinaciones de medicamentos, es necesario hacer es-
tudios completos de los medicamentos separados y de la combina-
ción de ellos.

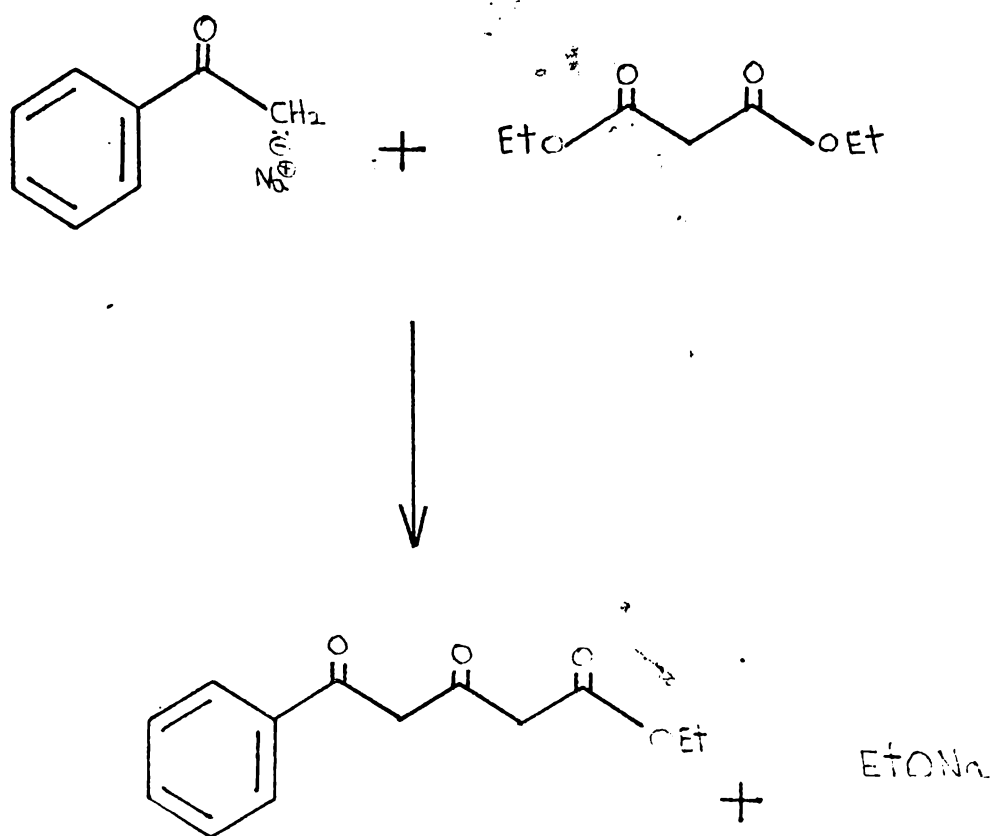
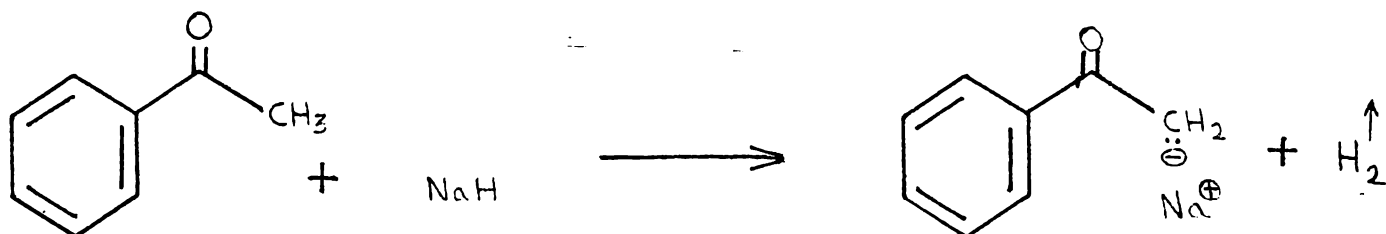
Por otra parte es importante realizar estudios de farmacoci-
nética para comprender las acciones del medicamento ya que ellos
nos dan información acerca de la velocidad de absorción del fár-
maco por diferentes vías, además se obtienen los niveles en dife-
rentes fluidos biológicos, su vida media y distribución en los -
distintos órganos así como su metabolismo y los metabolitos que
se producen y aparecen en sangre y orina, las rutas más importan-
tes de excreción y la velocidad con que se excreta son factores
necesarios para poder predecir su toxicidad. (143)

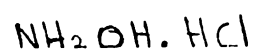
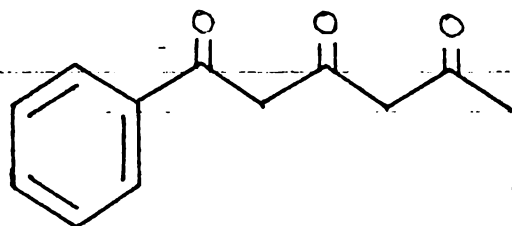
III.- Parte Experimental.

III.1.- Síntesis de Derivados del Isoxazol.

III.2.- Pruebas para demostrar la actividad biológica.

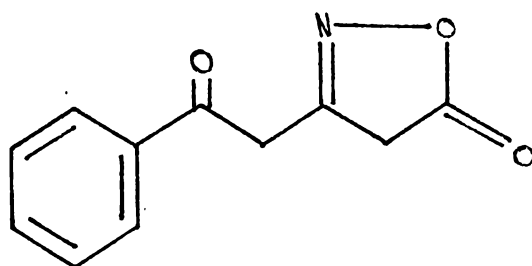
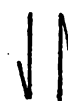
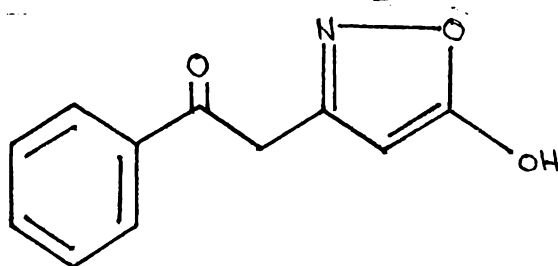
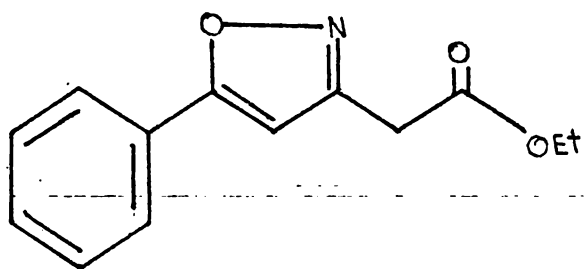
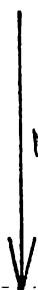
Para iniciar se describió una secuencia de reacción - entre el anión de la acetofenona y el malonato de dietilo para formar un compuesto tricarbónico que al reaccionar con Hidroxilamina nos diera una mezcla de isoxazoles sustituidos en las posiciones 3 y 5.





THF

NaOH a1 10%



El primer paso para realizar la condensación de Claisen, o sea la acilación de la acetofenona con el malonato de dietilo, es la formación del anión de la acetofenona por medio de un reactivo básico, tal como: alcóxido de sodio, sodio metálico, sodamida o hidruro de sodio, que sea capaz de extraer un proton del metilo de la acetofenona para formar el anión que reaccione inmediatamente con el malonato de dietilo formando el 5-fenil-3,5-dioxopentanoato de etilo. Se escogió Hidruro de Sodio porque ofrece algunas ventajas en cuanto a tiempo, aunque su manejo es más peligroso (144 y 147).

Después del 5-fenil-3,5-dioxopentanoato de etilo reaccionaría con el clorhidrato de hidroxilamina en presencia de una base para liberar a la hidroxilamina y así formar el 3-(etoxicarbonilmetil)-5-fenilisoxazol y la 3-(2-fenil-2-oxoetil)-5-isoxazolona que es la forma tautomérica del 3-(2-fenil-2-oxoetil)-5-hidroxisoxazol. Sin embargo la reacción con el Hidruro de sodio ofrece una mezcla de varios compuestos y aun así se adicionó el clorhidrato de hidroxilamina en presencia de bicarbonato de sodio al 10% obteniendo una mezcla de reacción todavía más abundante en componentes sin conocer el resultado real de la reacción. Por lo tanto se trato de repetir las reacciones sin lograr mejores resultados, ya que todas las reacciones se llevaron a cabo consecutivamente en la misma mezcla de reacción. (148 y 149)

Por lo que se encontró con el problema de no poder separar los componentes de la mezcla de reacción, lo cual nos obligó a pensar en métodos más efectivos de separación o en la realización de otra ruta sintética para la obtención de éstos y otros derivados del isoxazol.

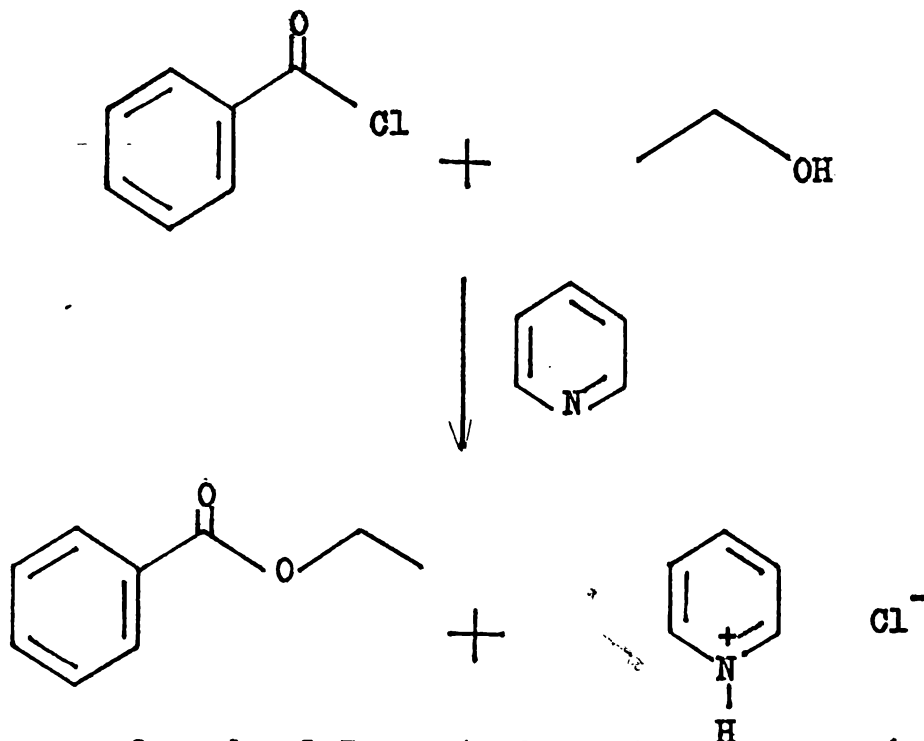
La revisión bibliográfica termina con la decisión de preparar el 3,5-difenilisoxazol, a partir de la acetofenona que reacciona con Hidruro de Sodio, para formar el anión correspondiente y éste a su vez con el Cloruro de Benzoilo para formar un compuesto dicarbonílico llamado Bibenzoilmetano ó 1,3-difenil-1,3propano dióna, el cual reaccionaría con el Clorhidrato de Hidroxilamina en presencia de una base, liberar a la hidroxilamina y así formar el 3,5-difenilisoxazol.

Sin embargo la formación del Dibenzoilmetano no pudo ser llevada a cabo por medio del Hidruro de Sodio ya que no se logra la condensación entre el anión de la Acetofenona y el Cloruro de Benzoilo, a diferentes temperaturas y variando el orden de los factores. (150)

Por lo tanto se optó por preparar el Dibenzoilmetano de acuerdo a la técnica descrita en el Organic Syntheses de 1955, la cual utiliza Benzoato de Etilo, Acetofenona y Etoxido de Sodio como catalizador para llevar a cabo la reacción. (151,152)

Posteriormente se realizó la reacción del Dibenzoilmetano -- con el Clorhidrato de Hidroxilamina, usando como base para liberar a la hidroxilamina, Bicarbonato de Sodio al 10% sin obtener resultados, entonces modificamos el pH, ya que se sabe que esta reacción es dependiente del pH, sin poder llegar al producto final, lo que forzó a utilizar una base más fuerte, Hidroxido de Sodio al 10%, logrando la formación del 3,5-difenilisoxazol.

Para realizar lo anterior primero se preparó el Benzoato de Etilo a partir del Cloruro de Benzoilo y Alcohol Etilico Absoluto en presencia de Piridina, la cual reacciona con el Cloruro de Benzoilo, secuestrando al Cloro y formando el Clorhidrato de Piridina.



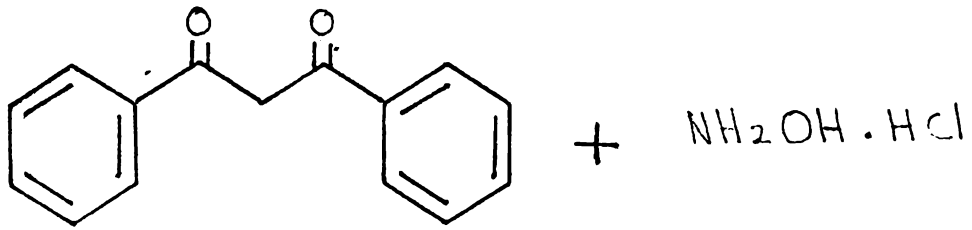
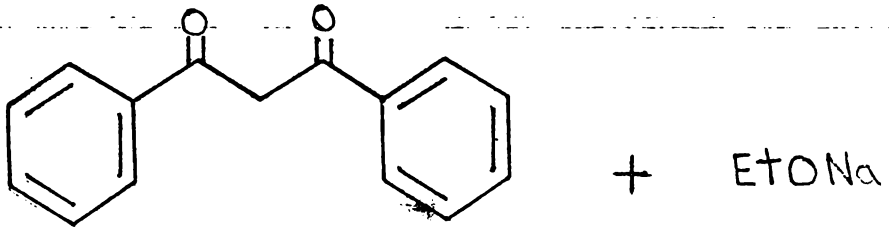
Una vez formado el Benzoato de Etilo se procedió a preparar el Etoxido de Sodio, el cual se prepara en el momento de llevar a

cabo la reacción entre la Acetofenona y el Benzoato de Etilo, ya que reacciona con el agua del medio ambiente descomponiéndose y es el catalizador de la reacción porque sustrae un patrón de la Acetofenona formando un anión el cual reacciona rápidamente con el grupo carbonilo del Benzoato de Etilo, formando el Dibenzoilmetano y Alcohol Etilico, éste último debe ser retirado de la mezcla de reacción para impedir que la reacción sea reversible, lo cual se logra calentando la mezcla de reacción provocando que el alcohol etílico sea destilado. (153 - 157)

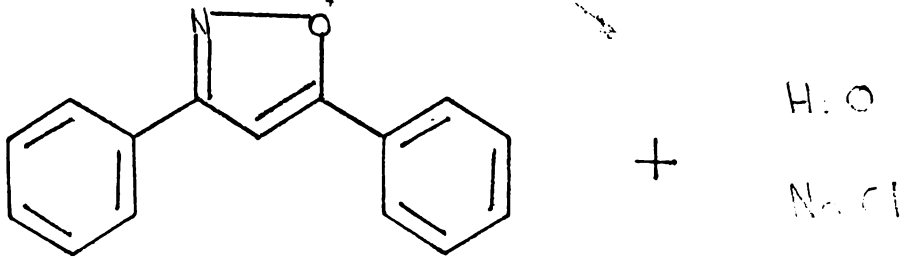
Posteriormente el Dibenzoilmetano es purificado por recristalización para utilizarse en la siguiente reacción con el Clorhidrato de Hidroxilamina en Tetrahidrofurano (THF) como disolvente e Hidróxido de Sodio al 10% como base para liberar a la Hidroxilamina, obteniéndose el 3,5-Difenilisoxazol como polvo cristalino de color amarillo claro el cual fue marcado con la clave IO-I para la determinación de sus características, comenzando por el punto de fusión el cual es de 129 - 131°C y no coincide con el reportado en el Beilstein, que es de 119 - 121°C. Por lo tanto el producto se recristalizó, obteniéndose un polvo blanquesino al cual se le determinó nuevamente el punto de fusión, la lectura fue de 134 - 135°C. Después de esto se realizaron los espectros de Infrarrojo y Resonancia Magnética Nuclear correspondiente.

(158 - 162)

Además al tener la 3,4,5-trimetoxiacetofenona como materia prima se pensó en obtener el derivado del Isoxazol correspondiente siguiendo el esquema de síntesis anteriormente descrito, sin embargo los metoxilos impiden la formación del anillo de cinco miembros y por lo tanto la formación de los derivados: 3-(3,4,5-trimetoxifenil)-5-fenilisoxazol y 5-(3,4,5-trimetoxifenil)-3-fenilisoxazol.



THF \downarrow NaOH (10\%)



Después de realizar algunas pruebas biológicas con el 3,5-difenilisoaxazol, se pensó en la posibilidad de utilizar otra vía de síntesis para lograr la preparación de algunos derivados con sus sustituyentes en diferentes posiciones de los anillos aromáticos, principalmente sustituyentes electronegativos en la posición "para".

La opción consiste en preparar el Benzoilacetato de etilo, el cual puede formar un anión en la posición al carbonilo del ester y reaccionar con un cloruro de ácido y así formar un compuesto tricarbonílico el cual posteriormente sufre una reacción de descarboxilación, dando el compuesto dicarbonílico necesario para llevar a cabo la reacción con Hidroxilamina en presencia de una base para obtener el isoaxazol correspondiente del cloruro de ácido que haya sido utilizado.

Por lo tanto se comienza por describir la síntesis del Benzoilacetato de etilo, a partir de Acetoacetato de etilo y Cloruro de Benzoilo por medio de Epóxido de Sodio para formar el anión del Acetoacetato, después de la condensación el producto es puesto en contacto con Cloruro de Amonio para producir la descarboxilación del compuesto tricarbonílico y así obtener el Benzoilacetato de etilo. Sin embargo esta técnica no funcionó y entonces se decidió preparar el Benzoilacetato de acuerdo a el método original del Organic Synthesis de 1963. Vol. 4., el cual utiliza Acetoacetato de etilo y Sosa para formar el anión, controlando la agitación vigorosa, la temperatura (5°C), el pH (cercano a 11) para no obtener bajos rendimientos, después se adicionan simultáneamente Cloruro de Benzoilo y Sosa al 33% lentamente, para asegurar que la condensación se lleva a cabo completamente una vez terminada la adición, la mezcla de reacción es llevada a 35°C durante 1 hora, el producto es un compuesto tricarbonílico al cual se le agrega Cloruro de Amonio y se le deja en agitación toda la noche para permitir la formación del Acetato de Amonio producto de la descarboxilación. Separando posteriormente la fase orgánica, la cual contiene al Benzoilacetato de Etilo el cual es purificado por destilación a presión reducida. (163)

Una vez obtenido el Benzoilacetato de etilo se procede a la formación de su anión correspondiente por medio de una base para extraer el protón α al carbonilo, lo cual se puede lograr con etóxido de sodio. α a/

Una vez formado el anión este se condensa con el cloruro de ácido correspondiente, para formar el 3,5-difenilisoaxazol. se utiliza el cloruro de benzoilo el cual se condensa con el anión del Benzoilacetato de Etilo para formar un compuesto tricarbónico, que deberá ser descarboxilado para obtener el Dibenzoilmetano necesario para la reacción con hidroxilamina.

El Benzoilacetato de Etilo reacciona con el etóxido de sodio formado el anión correspondiente, y este último a su vez condensa con el cloruro de benzoilo para darnos un producto tricarbónico, dicha condensación se tiene que realizar a bajas temperaturas en baños de hielo y con agitación constante (agitación mecánica vigorosa).

Después la mezcla de reacción es colocada en un matraz redondo para ser calentada en presencia de ácidos ya sea ácido clorhídrico diluido a 70°C o ácido acético al 85% o mezcla de ácido acético al 50% y ácido sulfúrico al 15% a partes iguales en reflujo, para lograr la descarboxilación, posteriormente la solución es enfriada y diluida con agua y éter para lograr la separación de las fases, después la muestra es neutralizada con Sosa al 20%. La fase orgánica es secada, el solvente destilado y el residuo separado en una columna para obtener el dibenzoilmetano correspondiente, el cual a su vez reaccionará con el clorhidrato de hidroxilamina en presencia de Sosa para formar el 3,5-difenilisoaxazol. (164)

III.1.1.- Reacciones.

III.1.1.1.- Preparación de 3-(etoxicarbonilmetil)-5-fenilisoxazol y la 3-(2-fenil-2-oxoetil-)-5-isoxazolona.

En un matraz seco de 100 ml de tres bocas se colocan 0.599g (0.02496 mol) de hidruro de sodio en 20 ml de THF con agitación constante durante una hora para disminuir el tamaño de partícula del hidruro, después se colocan dos embudos de adición y una trampa de humedad para permitir el escape de hidrógeno (H₂), en las bocas del matraz, sobre dichos embudos se colocan respectivamente 2.91 ml (0.02496 mol) de acetofenona y 3.789 ml (0.02496 mol) de malonato de dietilo recién destilado, ambos disueltos en 20 ml de THF. Posteriormente se adiciona la acetofenona gota a gota mientras la agitación continúa y la temperatura es mantenida en cero grados centígrados en un tiempo de 1 hora aproximadamente, al no haber cambio alguno se decidió llevar la reacción a temperatura ambiente, apareciendo un cambio en la coloración de amarillo a naranja lo que sugiere la formación del anión, después se dejó 1 hora más en agitación para asegurar que la reacción se llevó a cabo, entonces se agrega el malonato de dietilo gota a gota también, al no observarse ningún cambio se calienta la mezcla de reacción a una temperatura de 35 - 40°C, sin observarse ningún cambio, excepto al realizar una cromatografía en placa fina de la mezcla de reacción en la cual se observan dos diferentes manchas además de las materias primas utilizadas, entonces se adicionan 1.7344 g. (0.02496 mol) de clorhidrato de hidroxilamina observándose un cambio en la coloración de la mezcla de reacción a un tono café oscuro después se agregan 20 ml de una solución de bicarbonato de sodio al 10% y se deja en agitación durante toda la noche, observándose al día siguiente un cambio de coloración y consistencia a un tono amarillo y un producto gelatinoso del cual se realizaron placas cromatográficas en Hexano-Acetato de Etilo (80 - 20).

Después se intentó realizar la separación de la mezcla por cromatografía en columna sobre Sílica Gel (70-230 mallas) y aumentando la polaridad partiendo de Hexano al 100% obteniéndose 20 fracciones sin lograr la separación deseada con variaciones del 10% de Acetato de Etilo.

III.1.1.2.- Preparación de Dibenzoilmetano a partir de Acetofenona y Cloruro de Benzoilo.

En un matraz seco de 100 ml de 3 bocas se colocan 0.599g (0.02496 mol) de hidruro de sodio en 20 ml de THF con agitación constante, después se colocan dos embudos de adición y una trampa de humedad para permitir el escape de hidrógeno (H_2), en las bocas del matraz, sobre dichos embudos se colocan respectivamente 2.91 ml (0.02496 mol) de acetofenona recién destilada y 3.437 ml (0.02496 mol) de cloruro de benzoilo, ambos disueltos en 20 ml de THF. Posteriormente se adiciona la acetofenona gota a gota mientras la agitación continúa y la temperatura es mantenida en cero grados centígrados en un tiempo de 1 hora aproximadamente, entonces se agrega el Cloruro de benzoilo gota a gota también, observándose una ligera reacción, por lo cual se mantiene la agitación y la temperatura por 1 hora más para asegurar que la reacción se llevó a cabo, después se permite que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente, y se realiza una placa cromatográfica del producto en Hexano-Acetato de Etilo (80:20), sin obtener el resultado deseado ya que en la placa solo aparecen las materias primas utilizadas.

Lo que propicio la preparación del Dibenzoilmetano por otra vía de síntesis.

En un matraz de 1000 ml se colocan 200 ml de etanol absoluto (recién destilado y seco) y 74 ml de Piridina (destilada), por otra parte se colocan 100 ml de cloruro de benzoilo en un embudo de adición el cual es puesto sobre la boca del matraz, éste último es colocado en baño de hielo y sal a 0°C aproximadamente con agitación constante después de media hora el Cloruro de benzoilo es agregado gota a gota en un lapso de 30 minutos a 1 hora, después se deja en agitación por 1 hora más y se adicionan 100 ml de H₂O con hielo a la mezcla de reacción, después dicha mezcla es colocada en un embudo de separación, lavando la fase orgánica 2 veces con porciones de 200 ml de una solución de ácido clorhídrico al 5% para retirar el clorhidrato de Piridina y la piridina restante se lava con 200 ml de H₂O y después con 200 ml de Bicarbonato de sodio al 5% dos veces y por último se lava con 200 ml de agua H₂O. El producto es destilado en el rotavapor para quitar el exceso de etanol y después destilado a presión reducida para obtener el ester puro.

III.1.1.4.- Preparación del Etóxido de Sodio.

En un matraz de 100 ml de 2 bocas colocar una trampa de humedad y 50 ml de Etanol Absoluto (recién destilado y seco), en agitación constante a temperatura ambiente y agregar 4.1g de Sodio metálico en trozitos pequeños (hacer esta adición - tomando en cuenta la evolución del hidrógeno que se desprende), después de que todo el Sodio se haya disuelto, la solución del etóxido esta lista para ser utilizada, esta solución debe ser usada inmediatamente.

III.1.1.5.- Preparación del Dibenzoilmetano a partir de la acetofenona y el benzoato de etilo.

En un matraz de tres bocas de 500 ml se colocan 107.1 ml

de benzoato de etilo y 11.1 ml de acetofenona (recién destiladas) y una barra magnética para asegurar la agitación constante, ya que la mezcla de reacción se torna viscosa. Además en una de las bocas se coloca un embudo de adición con la solución de etóxido de sodio (recién preparada), un condensador para destilación en otra y en la tercera un termómetro para controlar la temperatura de la reacción. El matraz de reacción es calentado por medio de una manta de calentamiento y el control de la temperatura se realiza por medio de un reostato y ajustado a 150 - 160°C, una vez que se alcanza la temperatura deseada la solución de etóxido de sodio es adicionada gota a gota en un lapso de 1 hora bajo agitación constante (la adición es tan rápida como la evolución del etanol que se destila lo permita), la mezcla de reacción toma una coloración naranja y se torna muy viscosa, al terminar la adición se mantiene el calentamiento y la agitación durante 1 hora para asegurar que se llevó a cabo la reacción. Después se deja enfriar la mezcla de reacción a temperatura ambiente.

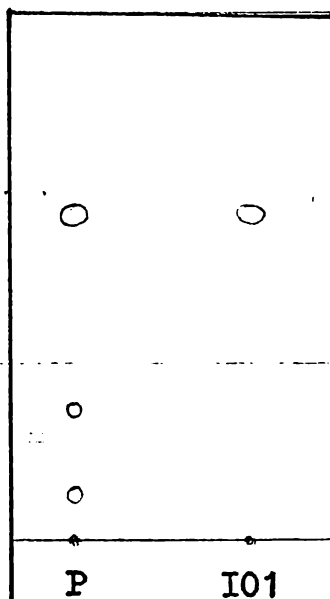
Agregar a la mezcla 100 ml de agua (H_2O) y pasar esta a un embudo de separación, adicionar una solución de 100 ml de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 12.5% en agua fría y agitar la mezcla vigorosamente.

La capa del ester es separada y lavada con 200 ml de agua y entonces agitada con porciones sucesivas de bicarbonato de sodio al 5%, hasta que la evolución de CO_2 cese, después de lo cual se lava nuevamente con 200 ml de agua (H_2O).

Además la solución de bicarbonato es extraída con 100 ml de éter, el extracto etéreo es lavado con 50 ml de agua (H_2O) y éste es combinado con la fase orgánica, ésta última es secada con sulfato de sodio anhidro y el éter removido por destilación en el rotavapor, el exceso de Benzoato de etilo es separado por destilación a presión reducida.

El aceite que se obtiene es el producto al cual se le enfría para provocar su cristalización, posteriormente se recristaliza en Metanol, adicionando Norita y filtrando en caliente primero y después enfriando a 0°C para obtener cristales.

les amarillos de punto de fusión de 76-78°C. A estos cristales se les dió la clave IO-1 para realizar su espectro de resonancia e infrarrojo, al igual que una placa cromatográfica en Hexano/Acetato de Etilo (9:1) revelada con luz U.V.



III.1.1.6.- Preparación del 3,5-difenilisoazol a partir de dibenzoilmetano y el clorhidrato de hidroxilamina.

Se colocan 7g. (0.0312 moles) de dibenzoilmetano en un matraz de tres bocas de 500 ml, posteriormente se agregan 100 ml de una mezcla Etanol-Agua (90-10) después se coloca un condensador de reflujo en la boca principal, un termómetro y un tapón en las laterales, manteniendo a la solución en agitación constante por medio de un agitador magnético para adicionar 4.338g (0.0624 moles) de Clorhidrato de hidroxilamina y 50 ml de Etanol-Agua (90-10). Calentar la mezcla de reacción hasta que se disuelvan los reactivos, tomando una coloración naranja, entonces se agrega una solución acuosa de sosa 8.739g (0.218 moles) en 75 ml de agua para llevar la mezcla de reacción a un pH completamente básico, después se deja en reflujo a una temperatura entre 70 y 75°C en agitación constante durante 3½ horas, al término de este tiempo se deja enfriar a temperatura ambiente y se deja en agitación aproximadamente 20 horas.

Posteriormente se agrega ácido clorhídrico concentrado gota a gota hasta llevar el pH a 3.5 y se deja en agitación por 5 horas más.

El precipitado se filtra en un buckner al vacío para separarlo y secarlo con el objeto de obtener el punto de fusión (129-131°C) y los espectros de infrarrojo y de resonancia magnética nuclear, por lo que el producto obtenido se marco con la clave IO-I. Además se realizó una cromatografía en placa fina para observar su pureza.

Por otra parte las aguas madres fueron concentradas hasta obtener la fase acuosa y un principio aceitoso de color café, a esta suspensión se le agrega eter para formar dos fases las cuales son separadas en un embudo de separación, guardando la fase acuosa y concentrando la fase etérea en el rotavapor, a la cual se le permite cristalizar obteniendo cristales amarillo claros, los cuales fueron filtrados en buckner al vacío y lavados con metanol frío.

El producto se puede recrystalizar en metanol al cual se le agrega un poco de carbon activado y después se lleva a ebullición y se filtra en caliente para retirar el carbon activado, el filtrado se concentra y se deja cristalizar en el congelador, para después filtrar al vacío y obtener el punto de fusión (134-135°C).

III.1.1.7.- Preparación del 1-(3', 4', 5'-trimetoxifenil)-3-fenil-
1,3-propanodiona a partir de la 3,4,5-trimetoxiaceto-
fenona y el benzoato de etilo.

Colocar en un matraz de tres bocas de 100 ml, 1.05g (0.005 moles) de 3,4,5-trimetoxiacetofenona y 6g (5.823 ml) (0.04 moles) de benzoato de etilo disueltos en 20 ml de etanol y una barra magnética para mantener la agitación constante, posteriormente colocar sobre las bocas del matraz, un embudo de adición que contiene una solución de (0.0065 moles) etóxido de sodio, preparada en ese momento, un equipo de destilación sobre la boca principal y un termómetro una vez que todo este listo el matraz de reacción es calentado por medio de una manta de calentamiento controlando la temperatura por medio de un reostato a 80°C inicialmente y el agitador magnético es encendido para mantener la agitación constante durante la reacción, ya que se alcanza la temperatura se agrega gota a gota la solución del etóxido de sodio, si a las primeras gotas no se observa reacción calentar hasta 120°C hasta observar reacción, o mayor temperatura si fuera necesario, entonces se mantiene la temperatura con una variación de $\pm 5^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos para destilar el etanol formado, después se deja enfriar la mezcla de reacción y se vacía sobre un vaso de precipitado con agua y hielo para su extracción, agregando eter etílico para disolución de la fase orgánica.

Posteriormente se agregan 50 ml de una solución de ácido sulfúrico al 12.5% en agua fría, se agita y se mezcla vigorosamente.

La mezcla de reacción es colocada en un embudo de separa

ción y la fase orgánica es lavada con agua y con porciones de bicarbonato de sodio al 5%, después las aguas madres se reúnen y se extraen con éter, uniendo las fases orgánicas y concentrándolas en el rotavapor hasta obtener un líquido aceitoso, el cual es destilado a presión reducida para retirar el benzoato de etilo, y así obtener el producto puro, sin embargo no fue posible obtenerlo puro, ya que aún duplicada la destilación a presión reducida, al realizar las placas cromatográficas correspondientes a las muestras, éstas nos dan al menos dos manchas.

El producto así obtenido trata de cristalizarse por enfriamiento sin lograr dicho propósito, posteriormente se intentó la cristalización después de disolver el producto en: etanol, metanol, cloroformo, éter, acetato de etilo, n-hexano, sin lograr la obtención de cristales. Por lo tanto se guardó el producto en refrigeración para constatar su estructura por espectrofotometría de infrarrojo y para realizar más análisis sobre él.

También se pensó en repetir la reacción pero ya no se tenía materia prima (3,4,5-trimetoxi acetofenona) y debido a que este y otros reactivos son de importación, se decidió suspender la preparación de los derivados del isoxazol por esta vía de síntesis.

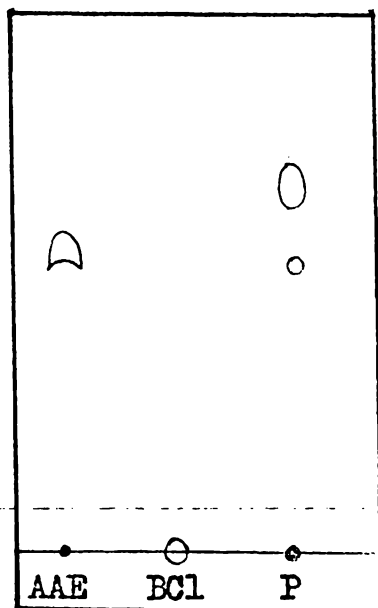
III.1.1.8.- Preparación del Benzoilacetato de etilo a partir de Acetoacetato de etilo y cloruro de benzoilo.

En un matraz de tres bocas de 500 ml, equipado con un mecanismo de agitación mecánica y dos embudos de adición de 125 ml, se son colocados 100 ml de agua, 50 ml de benceno y 39g (0.3 moles) de

Aceto acetato de etilo (recien destilado). La mezcla es enfriada a 5°C en un baño de hielo y 13 ml de una solución de hidróxido de sodio en agua al 33% son adicionados, la temperatura es mantenida por abajo de 10°C, el pH cerca de 11 y la mezcla es agitada vigorosamente, entonces se adicionan simultaneamente de los embudos de adición 46g (0.324 moles) de cloruro de benzoilo y 54 ml de hidróxido de sodio al 33%, esta adición debe ser hecha lentamente, después que la adición se termina, el baño de hielo es removido y la mezcla de reacción adquiere la temperatura ambiente, para asegurar que la reacción es completa la mezcla es calentada a 35°C durante 1 hora en agitación constante.

La agitación es entonces detenida y la capa acuosa es separada y colocada en un matraz erlenmeyer de 1 lt.

A la mezcla se le adicionan 16g de cloruro de amonio y entonces es colocada en agitación lenta durante toda la noche, la gravedad específica es llevada a 1.13 por adición de 18 g de cloruro de sodio después de lo cual la mezcla es transferida a un embudo de separación y 5 ml de benceno son utilizados para lavar el matraz y adicionados al embudo de separación, la capa acuosa es drenada y el aceite es lavado 3 veces con porciones de 20 ml de agua fría y separado en un matraz de bola de 100 ml, el embudo es lavado con 10 ml de benceno los cuales son adicionados al producto y este último es destilado bajo presión reducida, obteniéndose el benzoilacetato de etilo impuro, lo cual se confirma por cromatografía en capa fina en n-Hexano-Acetato de etilo (80:20).



III.1.1.9.- Preparación del Dibenzoilacetato de etilo a partir
del benzoilacetato de etilo y el cloruro de benzoilo.

Colocar en un matraz de 100 ml de tres bocas 2.79 ml (0.0147 moles) de benzoilacetato de etilo y 2.05 ml (0.0147 moles) de cloruro de benzoilo disuelto en 20 ml de etanol (recien destilado) y una barra magnética para mantener la agitación constante posteriormente se coloca un equipo de destilación en la boca principal, un embudo de adición y un termómetro en las bocas laterales. El matraz de reacción es calentado por medio de una manta de calentamiento controlando la temperatura por medio de un reostato a 80 °C y el agitador magnético es mantenido en agitación constante durante la reacción, una vez que todo esta listo se adiciona a partir del embudo de adición gota a gota una solución alcohólica (0.0147 moles) de etoxido de sodio, preparada en ese momento, después se incrementa 20°C la temperatura durante 30 minutos para

asegurar la destilación del etanol, posteriormente se deja enfriar la mezcla de reacción y se vacía sobre un vaso de precipitado con agua y hielo para su extracción, agregando eter etílico para disolución de la fase orgánica. La mezcla de reacción es colocada en un embudo de separación, la fase acuosa es desechada y la fase orgánica es concentrada en el rotavapor, para ser utilizada en la siguiente reacción.

III.1.1.10.- Preparación del Dibenzoilmetano a partir del dibenzoilacetato de etilo y una mezcla de ácidos acético y sulfúrico.

En un matraz de bola de 100 ml de 2 bocas se colocan 3.84 ml (0.01 mol) de dibenzoil acetato de etilo y una barra magnética para mantener la agitación constante, después se agregan 10 ml de una solución de ácido sulfúrico al 15% y 10 ml de una solución de ácido acético al 85%. La mezcla de reacción es calentada a reflujo con agitación constante durante 5 horas, después de lo cual se deja enfriar para adicionar 25 ml de agua, 25 ml de eter etílico y 20 ml de hidroxido de sodio al 20% para obtener un pH básico y un cambio de coloración. La fase orgánica es separada y la fase acuosa es extraída con eter dos veces en un embudo de separación, posteriormente las fracciones etéreas son reunidas y secadas con sulfato de sodio anhidro, el producto es concentrado en el rotavapor y el residuo separado en una columna de gel de silice de 60-230 mallas (ASTM) por medio de una mezcla de disolvente n-hexano acetato de etilo (80:20 y después 70:30), para obtener el dibenzoilmetano.

Para realizar todas las reacciones mencionadas anteriormente se utilizan los siguientes reactivos: Hidruro de sodio (Fluka) - granulado; Tetrahidrofurano (THF Merck para síntesis); Acetofenona (Merck para síntesis); Malonato de dietilo (J.T. Baker); Clorhidrato de hidroxilamina (Merck, R.A.); Bicarbonato de sodio (J.T. Baker Q.P.); Hidróxido de sodio (J.T. Baker Q.P.) en lentejas Cloruro de Benzoilo (Merck para síntesis); Etanol absoluto (Monterrey); Piridina (Merck para análisis); Acido Clorhídrico (J.T. Baker Q.P.); Benzoato de Etilo (preparado en el Laboratorio); sodio metálico (J.T. Baker en aceite, puro); Etóxido de Sodio (Preparado en el Laboratorio); Acido Sulfúrico (J.T. Baker Q.P.); Eter etílico (J.T. Baker Q.P.); Sulfato de sodio anhidro (Merck para análisis, secado al horno 100-110°C durante 2 horas y conservado en un frasco sellado en el desecador al vacío); Metanol (J.T. Baker); Carbón activado (Norita) (Merck para análisis); Dibenzoilmetano (preparado en el Laboratorio); Hexano (J.T. Baker); Acetato de Etilo (J.T. Baker); Sílica Gel (Merck, 70-230 mallas); Placas Cromatográficas de sílica gel con indicador Ultravioleta (Merck GF 254 de 10 x 10 cm); Cloroformo (J.T. Baker); Pentóxido de Fósforo (J.T. Baker); Benceno (J.T. Baker); Cloruro de Calcio (J.T. Baker, secado al horno 100-110°C durante 2 horas y conservado en un frasco sellado en el desecador al vacío); 3,4,5-trimetoxi acetofenona (Merck para síntesis); Acetona (J.T. Baker); Acetoacetato de etilo (Sigma); Cloruro de Amonio (Técnica Química); Cloruro de sodio (J.T. Baker); Acido acético (J.T. Baker); Benzoilacetato de etilo (preparado en el laboratorio).

Todas las materias primas y los disolventes son purificados de la siguientes manera:

Tetrahidrofurano es destilado sobre hidruro de calcio y después sobre hidruro de litio y aluminio, fraccionadamente, conservándolo en hidruro de calcio para evitar la formación de peróxidos, que son explosivos. (165)

Acetofenona por destilación simple a presión reducida.

Malonato de dietilo por destilación simple.

Piridina es destilada fraccionadamente, después de reflujo con sodio metálico.

Etanol Absoluto.- por destilación fraccionada, después de reflujo con magnesio.

Benzoato de Etilo destilado fraccionadamente a presión reducida.

Eter etílico.- es secado en sulfato de sodio anhidro.

n-Hexano por destilación fraccionada, después de reflujo con pentóxido de fosforo.

Acetato de etilo por destilación fraccionada, después de reflujo con pentóxido de fósforo.

Metanol o Alcohol metílico es destilado fraccionadamente, -- después de reflujo con magnesio.

Cloroformo por destilación fraccionada, después de reflujo con pentóxido de fósforo.

Benceno se refluja en Cloruro de calcio y con una trampa de Dean Stark para retirar el agua y después reflujarlo sobre sodio metálico y por último destilarlo fraccionadamente.

Acetona por destilación fraccionada, después de reflujo con permanganato de potasio hasta que el color violeta persista.

Aceto acetato de etilo por destilación fraccionada a presión reducida.

Benzoilacetato de etilo es destilado fraccionadamente a presión reducida. (165)

9 +

III.2.- Pruebas para demostrar la actividad biológica.

Una vez sintetizado un compuesto o aislado un principio activo de un producto natural, se proponen una serie de estudios con el objeto de demostrar su actividad farmacológica, por lo que debe ser administrado adecuadamente para lo cual hay que considerar sus propiedades fisicoquímicas, sobre todo su solubilidad, por lo tanto antes de llevar a cabo cualquier otra prueba se realizan ensayos para determinar la solubilidad del compuesto orgánico. Posteriormente se establece un breve bioensayo toxicológico con el propósito de asegurar que durante los estudios de eficacia el compuesto orgánico en la preformulación preparada, por la vía escogida y en la dosis administrada no causa efectos tóxicos o provoca la muerte de la especie animal utilizada. Ya con el estudio de seguridad preliminar establecido se realiza el estudio de eficacia correspondiente, por medio del cual se demuestra la actividad farmacológica del compuesto orgánico, para después efectuar los estudios de seguridad toxicología completos que nos indiquen la probabilidad de utilizar al nuevo compuesto terapéuticamente. Para llevar a cabo ambos tipos de estudios se requiere escoger las especies animales sobre las cuales se realizarán dichos estudios.

III.2.1.- Especies Animales Utilizadas.

Se decidió realizar ambos estudios sobre una misma especie animal para garantizar los resultados y además atra

vés de los mismos estimar las dosis para su uso terapéutico.

Debido a que la prueba de eficacia se realiza sobre el ratón albino por su facilidad de manejo, bajo costo de mantenimiento y alimentación en comparación con otras especies (conejo, cuyo, borrego) y a la factibilidad de reproducir el ciclo biológico de la Fasciola hepática en esta especie.

La prueba toxicológica y el estudio de absorción se realizaron también en dicha especie utilizando las cepas: Taconi y NIH de 12 a 14 semanas de edad con un peso promedio de 30 gramos.

En la realización de los diferentes experimentos, todos los ratones fueron escogidos completamente al azar en el momento de formar los lotes para cada bioensayo.

III.2.2.- Pruebas de Solubilidad.

Para poder administrar una sustancia a un ser vivo hay que considerar sus propiedades fisicoquímicas para utilizarlas en la mejor aplicación de la sustancia en cuestión. La primera propiedad que debemos tomar en cuenta es la solubilidad, la cual en el caso del 3,5-difenilisoaxazol no es de mucha ayuda para facilitar su administración, ya que es muy poco soluble en compuestos polares, parcialmente soluble en compuestos no polares y muy soluble en compuestos de polaridad intermedia como el cloroformo.

Debido a esto no fue posible solubilizarlo en Etanol, Isopropanol, Polietilenglicol (disolventes utilizados en la administración de compuestos orgánicos), lo cual nos obligó a utilizar Aceite de Maiz, Ajonjolí, etc., y también a buscar agentes tenso-

activos como el Tween 80 y Span 20, que nos permitieran solubilizarlo, logrando una solución en Aceite de Ajonjolí.

Además se preparan suspensiones en agua destilada y - solución salina isotónica del 3,5-difenilisoazol. (166-169)

III.2.3.- Estudios de Toxicidad.

Antes de evaluar la actividad biológica de una sustancia se requiere estimar la toxicidad de dicha sustancia para asegurar que las dosis administradas, por la vía escogida y en la preformulación preparada, no causan efectos tóxicos o provocan la muerte de la especie animal sobre la cual se realizan tales evaluaciones.

Por lo tanto las pruebas realizadas a este respecto son de toxicidad aguda exclusivamente, utilizando dos preformulaciones del 3,5-difenilisoaxazol una solución oleosa en Aceite de Ajonjolí y una suspensión acuosa, así como dos vías de administración: oral e intraperitoneal, administrándose las siguientes dosis: 62.5, 31.25, 15.625 y 7.8 mg/kg a cada lote de 6 ratones albinos sanos, los cuales permanecieron en observación durante 7 días; después, todos los ratones fueron sacrificados para realizarles la necropsia y así poder observar los órganos principales (hígado, riñón, pulmones, etc.) con el objeto de encontrar lesiones, inflamación o algún indicio de toxicidad sobre los órganos antes mencionados.

Los resultados indican que ninguno de los ratones murió debido a la administración del 3,5-difenilisoaxazol en ninguna de sus dos preformulaciones y por ambas vías de administración aún a dosis de 62.5 mg/kg. Además no se observó macroscópicamente ninguna lesión sobre los órganos principales. Tablas 7y8.

Cabe señalar que no se realizaron cortes histológicos, ni se determinó la dosis letal cincuenta, ya que el propósito de estas pruebas solamente fue evaluar que las dosis administradas

no causaran la muerte o daños tóxicos aparentes.

Después se repitieron los bioensayos utilizando diez dosis diferentes y lotes de 10 ratones cada uno, dejando en observación a los ratones durante catorce días, para confirmar los resultados obtenidos anteriormente.

112

III.2.4.- Estudios de Eficacia.

Los estudios de eficacia son de suma importancia ya que de ellos depende el éxito o fracaso de una investigación que pretende encontrar un nuevo fármaco en el área quimicofarmacéutica.

Desde el inicio de nuestra investigación, el tema de interés es el referente a las sustancias que tienen posibilidad de actuar como antihelmínticos, por lo cual las pruebas de actividad biológica que nos interesan, son aquellas que nos sirvan para determinar la efectividad de los compuestos orgánicos sobre los helmintos, ya sea en un cultivo "in vitro" de los parásitos o en una prueba "in vivo" en un huésped (animal de laboratorio) infectado con los parásitos, natural o artificialmente.

Al respecto nosotros esperabamos que dichos estudios de eficacia fueran realizados fácil y rápidamente en las escuelas de Medicina o Veterinaria de la misma Universidad, sin embargo no tienen ninguna prueba montada y estandarizada para determinar la actividad antihelmíntica de compuestos orgánicos. Entonces pensamos en las Instituciones de Salud Pública: SSA (Secretaría de Salubridad y Asistencia); S.A.R.H. (Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos); ISSSTE (Instituto de Seguridad Social al Service de los Trabajadores del Estado); IMSS (Instituto Mexicano de del Seguro Social); Instituciones Educativas: IPN (Instituto Politécnico Nacional) U.A.M. (Universidad Autónoma Metropolitana); etc. sin conseguir información o reportes que nos indicaran que algún grupo de trabajo pudiera probar la actividad de un compuesto orgánico contra algún helmineto. Solo teniamos conocimiento del INIP (Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias) y del

C.N.P.A. (Centro Nacional de Parasitología Animal) en ambas instituciones tenían aparentemente la facilidad para probar la actividad de sustancias contra Fasciola hepática (Tremátodo perteneciente a la familia de los Platelminfos). Debido a las mayores facilidades otorgadas por el C.N.P.A., para la realización de este trabajo decidimos interaccionar directamente con los integrantes de dicha institución, llegando a establecer un protocolo para la determinación de actividad antihelmíntica.

de compuestos orgánicos entre el departamento de parasitología del C.N.P.A., y el departamento de química farmacéutica y productos naturales de la D.E.Pg. de la Facultad de Química, U.N.A.M.

Después de realizar el contacto con el C.N.P.A., iniciamos el estudio basándonos en la técnica para reproducir la fasciolosis en el laboratorio mediante caracoles (huésped intermediario) y ratones albinos (huésped definitivo).

Para poder diseñar el estudio de eficacia tenemos que conocer el ciclo de vida del helminto en cuestión, para programar los tratamientos, la lectura de resultados y todos aquellos parámetros que puedan influir cuando se trate de reproducir dicho ciclo en el laboratorio.

III.2.4.1.- Ciclo de vida de Fasciola hepática.

La Fasciola adulta se encuentra en los conductos biliares de varios animales hervívoros y es un organismos aplanado en forma de hoja. Los gusanos adultos son hermafroditas, pero la autofecundación en ellos es probablemente la forma más común de su reproducción sexual. El embrión encápsulado se divide antes de abandonar el útero materno y sale del hospedero en las heces.

Bajo condiciones ambientales favorables (agua y temperatura), el embrión se transforma en una forma larvaria ciliada, el miracidio, el cual brota y nada con ayuda de sus cilios. Si el miracidio encuentra un caracol de la especie adecuada (Lymnaea),

en pocas horas penetra en él y pierde sus cilios, transformándose se en un esporocisto en forma de saco. A medida que este último crece, se desarrollan nuevas formas larvarias en su interior, - estas reciben el nombre de redias, las cuales abandonan el esporocisto y se dirigen a la glándula digestiva (hepatopáncreas) del caracol hospedero. A medida que crece la redia primaria o madre, en su interior se desarrolla una redia hija, finalmente la redia dá origen a otro tipo embrionario, la cercaria. Esta forma tiene una cola y después de abandonar a la redia, escapa del caracol hacia el agua que lo rodea y en unos minutos, a lo más en pocas horas, la cercaria se enquistada sobre una hoja de pasto u otra vegetación y se transforma en metacercaria. Esta forma enquistada es capaz de infectar a un nuevo hospedero cuando inadvertidamente es ingerida con la vegetación que sirve de alimento. Después de ser ingerida la metacercaria se desenquista en el duodeno y migra hacia la pared intestinal, continúa hacia el parénquima hepático y alcanza los ductos biliares donde permanecen alimentándose del epitelio de los canales, de los mismos componentes de la bilis y probablemente de la sangre liberada por la actividad antes mencionada. (170)

Una vez que se conoce el ciclo de vida de Fasciola hepática en general se podrá entender mejor como se reproduce dicho ciclo en el laboratorio.

III.2.4.2.- Reproducción del ciclo de vida de Fasciola hepática en el laboratorio.

Para reproducir el ciclo de vida se utiliza a los caracoles del género (Lymnaea) como huéspedes intermediarios y a los ratones albinos como huéspedes definitivos de la Fasciola hepática.

a) Obtención de embriones (huevos) de Fasciola hepática.

Dichos embriones se obtienen a partir de vesículas biliares de animales infectados con Fasciola hepática: Hígados y -

vesículas biliares de bovinos u ovinos decomisados en el rastro o hígados y vesículas biliares, o huevos de las heces, de ratones y conejos infectados en el laboratorio.

Los embriones son aislados mediante lavados de la bilis extraída de las vesículas y cultivados en agua destilada a 29°C durante 12 días en la obscuridad hasta que el miracidio eclosiona del embrión, al ser expuesto a la luz.

b) Obtención de Caracoles.

Para iniciar se toman diez caracoles de campo y se reproducen en el laboratorio obteniendo una cepa limpia, manteniéndolos en cajas de petri acondicionadas en forma de un microhabitat con sustrato de tierras arcillosas (gomosas) en las que previamente se siembran microalgas del género Oscillatoria las cuales sirven de alimento a los caracoles. Dichos caracoles son mantenidos a temperatura ambiente, después de 24 horas se colectan las masas ovijeras producto de la oviposición de dichos caracoles.

Las masas ovijeras son colocadas en cajas de petri; e incubadas en agua destilada a 29°C durante 12 días en la obscuridad, para obtener caracoles recién nacidos, los cuales son cultivados en cajas de petri con microalgas durante 30 días. (171,172)

c) Obtención de microalgas (Oscillatoria spp.)

Estas se obtienen de zonas o lugares fangosos por colecta en sedasos o coladeras con malla de 2 mm.

Estas se reproducen en el laboratorio en cajas de petri acondicionadas con una base de tierras arcillosas de 1 cm., de altura en las que son sembradas y posteriormente son expuestas a un sistema de luz durante las 24 horas del día.(173)

d) Obtención de metacercarias (Forma infectante del hospedero -

definitivo).

A los caracoles de 30 días de edad obtenidos en el laboratorio se exponen en forma individual en un frasco vial al contacto con cuatro miracidios, durante tres horas a temperatura ambiente en agua destilada, posteriormente los caracoles son colocados en cajas de petri con microhabitat, dándoles mantenimiento a base de microalgas durante 35 a 60 días.

Después los caracoles infectados, son colocados de cuatro en cuatro en vasos de precipitados de 100 ml forrados en su pared interna con papel encerado, agua destilada y trozos de hielo para provocar un cambio brusco de temperatura y así propiciar la liberación de las cercarias, las cuales se enquistan en el papel encerado, tomando la forma de metacercaria.

Posteriormente se mantiene a las metacercarias en el papel encerado con agua destilada en su forma latente en refrigeración a 4°C durante 15 a 45 días.(174)

e) Infección del hospedero definitivo .

Como ya se ha dicho se utilizó al ratón albino como hospedero definitivo, el cual fue infectado por vía oral con 12 metacercarias, que fueron desprendidas del papel encerado en el cual se encontraban enquistadas bajo refrigeración a 4°C y colocadas en agua destilada para ser administradas por medio de una pipeta pasteur. Los ratones son puestos en jaulas en las cuales se les retira el agua 6 horas previa infección con objeto de facilitar la ingestión de las metacercarias administradas.

Después de la infección de los ratones albinos, se realiza un seguimiento de dicha infección en un lote de 60 ratones con el objeto de sacrificar un par de ellos cada dos días a partir del día de la infección (día cero), y al llevar a cabo las necropsias se encuentra que las cercarias migran del duodeno a través de la pared intestinal, se convierten en gusanos jóvenes al alimentarse del parenquima hepático entre el 2º y 14º día postinfección, a partir del 14º al 28º día el gusano realiza su migración a través de todo el hígado para tener su fase aguda en este lapso de tiempo y llegar a ser adulto en el momento de alcanzar los conductos biliares en donde permanece reproduciéndose, presentándose la fase crónica después de los 35 días post infección. (175)

La gran mayoría de los ratones muere entre el 22º y 28º día a causa de la Fasciolosis, lo cual obligó a repetir el experimento infectando a los ratones con 8 metacercarias y después con 6 metacercarias para tratar de obtener ratones que llegarán a la fase crónica ya que la carga parasitaria es muy elevada cuando se administran 12 metacercarias a cada ratón.

III.2.4.3.- Determinación de la carga Parasitaria.

Los parámetros que influyen en la determinación de la carga parasitaria son los siguientes:

- a) Edad de las metacercarias. (viabilidad de las metacercarias).
- b) Variabilidad biológica de la cepa de ratones utilizada.

De estos dos, el inciso (b) no lo podemos controlar, pero si lo podemos modificar, cambiando de cepa en caso necesario.

Para determinar la viabilidad de las metacercarias de acuerdo a su edad, se escogieron 6 lotes de 10 ratones cada uno los cuales fueron infectados a los 5, 10, 20, 30, 45 y 60 días después de haber obtenido las metacercarias, utilizando una carga parasitaria de diez metacercarias para cada ratón. Los resultados obtenidos después de la necropsia de todos los ratones que llegaron vivos a los 28 días postinfección o sobre los que murieron antes de esta fecha, son presentados en la tabla N° 9 y de acuerdo a estos, la edad de las metacercarias es importante para la validación de la técnica.

Posteriormente utilizando metacercarias de 15 a 45 días de edad, determinamos la carga parasitaria, escogiendo 6 lotes de 10 ratones cada uno, los cuales fueron infectados con 12, 10, 8, 6, 4 y 2 metacercarias respectivamente, para obtener el porcentaje de fasciolas adultas de acuerdo al número de metacercarias administradas y además el porcentaje de ratones que pueden llegar a la fase crónica de acuerdo a la carga parasitaria, los resultados se muestran en la tabla N° 10

Dichos resultados son obtenidos al realizar la necropsia después de 35 días postinfección sobre todos los ratones que llegaron vivos o sobre los que murieron antes de esta fecha, contando el número de fasciolas obtenidas.

Por lo tanto para realizar estudios de eficacia en la fase aguda, se puede utilizar una carga parasitaria de 12, 10,-

8 o 6 metacercarias a cada ratón con lo cual se garantiza una infección de por lo menos 2 fasciolas, siempre y cuando las metacercarias utilizadas tengan entre 15 y 45 días de edad. - Para estudios de eficacia en la fase crónica se puede utilizar una carga parasitaria de 6 o 4 metacercarias a cada ratón, con lo cual se garantiza una infección de por lo menos 1 fasciola.

III.2.4.4.- Tratamiento de acuerdo a las fases de la infección.

De acuerdo al seguimiento de la infección del ratón albino por Fasciola hepática, la fase aguda se presenta después del 14° día postinfección por lo tanto el tratamiento debe darse en esta fecha más o menos un día para asegurar la actividad sobre las fasciolas jóvenes. Se decidió dar el tratamiento el 15° día postinfección, realizando necropsias sobre los ratones que llegaron vivos al 28° día de haber iniciado el experimento o sobre los que murieron antes de esta fecha.

Para el tratamiento en la fase crónica, la cual se presenta después del 35° día postinfección, hay que esperar hasta llegar a esta fecha y aplicar el tratamiento a partir de este día para asegurar la actividad sobre fasciolas adultas. - Se decidió dar el tratamiento exactamente el 35° día postinfección, realizando necropsias sobre los ratones que llegaron vivos al 42° día de haber iniciado el experimento o sobre los que murieron antes de esta fecha.

III.2.4.5.- Controles y/o testigos en los estudios de eficacia.

Para que un bioensayo se desarrolle satisfactoriamente se requiere de grupos testigo o controles que nos permitan verificar aquellos parámetros que no pueden ser controlados durante el desarrollo del experimento en cuestión. Existen varios tipos de controles, en el caso que nos ocupa: La prueba biológica para determinar la actividad antihelmíntica de compuestos orgánicos, sobre Fasciola hepática en el ratón albino, se requieren varios: grupo testigo de la cepa de ratones utilizados sin infección y sin tratamiento, al cual se le considera un control para observar el comportamiento de los ratones durante el experimento. También se requiere un grupo testigo de la infección, el cual es infectado y mantenido sin tratamiento, al que se le considera un control para observar el proceso de la infección durante el bioensayo. Además se necesita un grupo testigo del tratamiento, el cual emplea ratones sin infección y en lugar de tratamiento se administra el disolvente utilizado, el día específico de tratamiento, por la misma vía e idéntico volumen, al que se le considera un control para observar el efecto del disolvente y del estress provocado por la administración. También se requiere un grupo testigo del tratamiento pero con infección al cual se le administra el disolvente utilizado el día específico de tratamiento, por la misma vía e idéntico volumen, al que se le considera un control para observar el efecto del disolvente sobre los parásitos durante el bioensayo.

Por otra parte se puede tener un grupo testigo que sirva de comparación para la evaluación, a base de un fármaco conocido que tenga la actividad que nosotros queremos demostrar, uti

//

lizando dicho fármaco a una concentración conocida y bajo las mismas condiciones de experimentación que el compuesto orgánico a probar.

III.2.4.6.- Pruebas de actividad antihelmíntica del 3,5-difenilisoaxazol contra Fasciola hepática.

Para realizar las pruebas de toxicidad aguda y actividad antihelmíntica del 3,5-difenilisoaxazol, se llevan a cabo los bioensayos escogiendo a 100 ratones albinos machos tomando al azar a 3 ratones de diferentes pesos 15.1, 26.6 y 30.2 gramos respectivamente a los cuales se les dió muerte para efectuar las necropsias y así verificar las condiciones de salud de los animales de experimentación.

Posteriormente todos los ratones fueron pesados y lotificados homogéneamente de acuerdo a su peso. Los primeros tres lotes formados por 30 ratones son los grupos testigo ya que siempre son los de menor peso.

El lote N° 10 formado por diez ratones fue utilizado para determinar la dosis letal del 3,5-difenilisoaxazol.

Los 57 ratones restantes se infectan con 12 metacercarias a cada uno y se dividen en 5 lotes de diez ratones y 1 lote de siete ratones, para evaluar al 3,5-difenilisoaxazol contra Fasciola hepática en la fase aguda.

* Después se preparan las diluciones de la preformulación de

aceite de ajonjolí (solución oleosa) y solución salina isotónica

(suspensión acuosa), pesando 0.25 g del 3,5-difenilisoaxazol a

los cuales se les agregaron 2 ml de aceite de ajonjolí o 2 ml de

solución salina isotónica y una gota de tween 80, posteriormente

se agitan en el vortex durante 1 minuto, tomando 1 ml de cada uno

para colocarlos en otros tubos, y adicionar 1 ml de aceite de

ajonjolí o 1 ml de solución salina isotónica según sea el caso, -

agitando nuevamente en el vortex durante 1 minuto, para volver a -

tomar 1 ml y así sucesivamente preparar todas las diluciones.

La tabla N° 6 muestra las concentraciones preparadas y las -

dosis administradas suponiendo que un ratón tiene un peso aproxi-

mado de 30 gramos y que el volumen administrado es de 0.5 ml ya -

sea por vía intraperitoneal o por vía oral.

TABLA N° 6

Concentración (mg/ml)	Dosis (g/kg)
1.- 125	2.083
2.- 62.5	1.0416
3.- 31.25	0.5208
4.- 15.625	0.2604
5.- 7.8125	0.1302
6.- 3.90625	0.0651
7.- 1.953125	0.03255
8.- 0.9765625	0.01627
9.- 0.48828125	0.008133
10.- 0.0 (solvente)	0.0 (solvente)

El lote N° 10 fue escogido para administrar todas y cada una de las dosis a cada ratón, por una vía establecida para determinar la toxicidad del 3,5-difenilisonrazol.

El lote N° 9 es el testigo de la infección por Fasciola hepática al cual no se le dá tratamiento.

El lote N° 6 es el testigo del tratamiento sobre los animales infectados, en este solo se administra el solvente utilizado en la preformulación.

Los lotes N° 4, 5 y 7 son para demostrar la actividad del 3,5-difenilisonrazol a las siguientes dosis: 130, 65 y 32.5 mg/kg respectivamente.

El lote N° 8 es para demostrar la actividad del 3,5-difenilisonrazol a una dosis de 65 mg/kg/día, durante 3 días.

Las soluciones para estos bioensayos fueron preparadas en matraces aforados de 50 ml utilizando como excipientes el aceite de ajonjolí y a la solución salina isotónica, cuando por la dilución de 390.625 mg en 50 ml o 7.8125 mg/ml, corresponde a una dosis de 130 mg/kg, para después diluir esta al cincuenta por ciento para obtener las soluciones restantes.

Los resultados son expresados en la tabla N° 11 de la 42.

También son reportados los resultados de dos productos comerciales utilizados como referencias para demostrar la actividad antihelmíntica en la tabla N° 43 de la 54.

114

III.2.5.- Estudio de la absorción del 3,5-difenilisoaxazol.

Después de realizar algunas pruebas biológicas con el 3,5-difenilisoaxazol sin obtener la actividad antihelmíntica deseada, se pensó en modificar la vía de administración y en realizar experimentos que nos permitieran conocer su absorción ya que si una sustancia no es administrada adecuadamente, su absorción es pobre, no se alcanzaría la concentración requerida para producir la acción y por lo tanto los resultados de su evaluación farmacológica y toxicológica serían erróneos.

Este estudio de absorción tiene como objetivo determinar el coeficiente de permeabilidad y el grado de excreción del 3,5-difenilisoaxazol, después de su administración en suspensión acuosa (solución salina isotónica) y en solución oleosa a ratones.

Para llevar a cabo el estudio de absorción in vivo se utilizaron 24 ratones, los cuales fueron pesados y divididos en dos grupos. El primer grupo se empleó para la administración de una suspensión del 3,5-difenil isoaxazol en solución salina isotónica por vía intraperitoneal. A los 4 primeros ratones se les administraron diferentes dosis: 7.8, 15.6, 31.2 y 62.5 mg/kg a cada uno, a los siguientes 6 ratones una dosis de 31.2 mg/kg, dejando a 2 como testigos sin administrarles el producto. Al segundo grupo de ratones se les administraron las mismas dosis por vía intraperitoneal pero en solución oleosa, dejando también 2 ratones testigo, posteriormente a la administración, se colocaron individualmente en jaulas metabólicas para coleccionar orina y heces fecales, a diferentes tiempos: los primeros 4 ratones de cada grupo, orina de

0 a las 48 horas; los siguientes 3 ratones, heces de 0 a las 72 horas, los testigos 1 ratón, orina de 0 a las 48 horas y 1 ratón, heces de 0 a las 72 horas. (176)

Las muestras de orina y heces fecales se analizaron por cro-
matografía de gases siguiendo el procedimiento descrito en el -
diagrama de la figura N° 56.

En las tablas N° 57 y 58 se muestran los resultados de la can-
tidad excretada en orina y heces fecales a las 48 y 72 postad -
ministración del 3,5-difenilisoxazol, con lo cual se demuestra -
que solo el $1.2 \times 10^{-1}\%$ es excretado.

También se realizó una prueba de absorción in vitro del 3,5-
difenilisoxazol, empleando el método del intestino invertido de -
rata, utilizando Diazepan como referencia para evaluar y comparar
el coeficiente de permeabilidad. (177) y 178)

En este experimento se utilizaron ratas machos de la cepa -
Winstar de un peso promedio de 220 gramos.

El aparato que se utiliza fue descrito por Crane y Wilson -
para el método del intestino invertido.

Dieciocho horas antes del experimento se le retira el ali -
mento a la rata macho que va ha ser empleada,
permitiendo el libre acceso al agua, después se sacrificó con -
éter y se extrajo el intestino delgado colocándolo en una caja de
petri con solución Krebs-Ringer, lavándolo con la misma solución,
posteriormente se ligo uno de los extremos con sedazo de catgut
000 (hilo para cirugía) y con una varilla de vidrio de punta -
roma, se invirtió el intestino, se cortaron segmentos de 10 cm de
la porción del yeyuno y a cada segmento se le introdujo una cúnu-
la de polietileno perforado, ligando ambos extremos.

114

En un tubo de ensaye de 50 ml se colocaron 40 ml de la solución Krebs-Ringer y se adicionaron 200 mcl de la solución que contenía 1 mg/ml del 3,5-difenilisoaxazol para obtener una concentración de 5 mcg/ml, el cual se mantuvo a una temperatura constante de 37°C, mientras que la aereación se llevó a cabo por medio de una mezcla de oxígeno y dióxido de carbono (95:5) a una velocidad de 10 a 30 ml por minuto, bajo agitación constante, posteriormente se sumergió el intestino invertido en el tubo de ensaye, dentro del cual se colocaron 2 ml de solución Krebs-Ringer, después de 20 minutos se extrajo la solución serosal (2 ml de solución Krebs-Ringer en el saço del intestino invertido), se lavó con 1 ml de solución y se añadieron otros 2 ml de solución Krebs-Ringer. Este procedimiento se repitió durante 5 veces a intervalo de 20 minutos.

~~El procedimiento para estudiar la absorción in vitro del diazepam, fue el mismo del intestino invertido de rata. En otro tubo de ensaye de 50 ml se colocaron 40 ml de la solución de Diazepam para obtener una concentración de 100 mcg/ml, se trabajó en las mismas condiciones, ya mencionadas.~~

Las muestras de 3,5-difenilisoaxazol y de diazepam fueron analizadas por cromatografía de gases siguiendo los procedimientos descritos anteriormente para los experimentos in vivo.

Los resultados son expresados en (ml/min) en las tablas N° (59 y 60).

IV RESULTADOS.

IV.1.- Resultados de las reacciones
de síntesis.

IV.2.- Resultados de las pruebas para
demostrar la actividad biológica.

IV.1.- Resultados de las reacciones de síntesis.

IV.1.1.- En la preparación de 3-(etoxicarbonilmetil)-5-fenil-isoxazol y 3-(2-fenil-2-oxoetil)-5-isoxazolona.

Se obtuvo una mezcla de productos difícil de separar por lo cual se cambió la vía de síntesis.

IV.1.2.- En la preparación del dibenzoilmetano, a partir de Acetofenona y cloruro de benzoilo no se obtuvo el producto debido a que fracasó la condensación al utilizar hidruro de sodio.

IV.1.3.- La reacción de preparación del Benzoato de etilo, tiene un rendimiento del 93%, ya que se obtuvieron 14.1 ml al partir de 100 ml de cloruro de benzoilo.

IV.1.4.- En la preparación de la solución alcohólica de etóxido de sodio no se puede calcular el rendimiento.

IV.1.5.- Durante la reacción de la acetofenona y el benzoato de etilo para obtener el dibenzoilmetano, se realizan varias extracciones y recristalizaciones lo cual disminuye el rendimiento hasta un 64.7%, después de pesar 13.84g. de dibenzoilmetano, preparados a partir de 11.1 ml de acetofenona.

IV.1.6.- La reacción de preparación del 3,5-difenilisoaxazol a partir del dibenzoilmetano y el clorhidrato de hidroxilamina, tiene un rendimiento del 83.06% ya que se obtuvieron 5.73 g. a partir de 7g. de dibenzoilmetano.

IV.1.7.- En la preparación de 1-(3, 4, 5-trimetoxifenil)-3-fenil-1-3-propanodiona, el producto que era un líquido aceitoso, siempre estuvo impuro, lo cual impidió conocer la validez de la reacción y el rendimiento de la misma.

IV.1.8.- En la preparación del Benzoilacetato de etilo, se obtuvieron 40.37 ml del producto impuro, después de la destilación a presión reducida, lo cual corresponde a un 72.1% con respecto al cloruro de benzoilo utilizado en la reacción.

IV.1.9.- En la reacción de preparación del dibenzoilacetato de etilo, no se puede calcular el rendimiento ya que no se aisla el producto de la mezcla de reacción, solo se extrae y se concentra para ser utilizado en la siguiente reacción.

IV.1.10. Al obtener dibenzoilmetano, a partir del dibenzoilacetato de etilo por descarboxilación através de una mezcla de ácidos acético y sulfúrico. el rendimiento es el de la reacción anterior y , por lo cual

la a partir del benzoilacetato de etilo utilizado inicialmente 2.79 ml. Así al separar la mezcla de reacción por cromatografía y concentrar las fracciones extraídas de la columna se obtuvieron 2.97 g de dibenzoilmetano-- que equivalen a un 81.3% de rendimiento.

Tabla N° 7

3,5-difenilisoaxazol en suspensión acuosa y solución oleosa, administrado por vías oral e intraperitoneal, en un volumen de 0.5 ml que corresponde a una dosis de 62.5 mg/kg. Resultados de la observación de los órganos principales después de la necropsia.

Organos	Hígado	Corazón	Riñón	Pulmón
Tamaño	normal	normal	normal	normal
Color	normal	normal	normal	normal
Consistencia y tonicidad	normal	normal	normal	normal

Los resultados son los mismos para las dos preparaciones, las dos vías de administración y las cuatro dosis probadas (31.25, 15.625 y 7.8125 mg/kg), después de 7 días de administración del 3,5-difenilisoaxazol.

Incompatibilidad

Suspensión acuosa

Ninguna

Solución oleosa

Ninguna

TABLA N° 9

Infección por Fasciola hepática, en relación a la edad de las metacercarias (forma infestante del hospedero definitivo), en ratón blanco Mus musculus (NIH)

	Metacercarias de (n) días *					
	n=5	n=10	n=20	n=30	n=45	n=60
Número de Fasciolas obtenidas en cada ratón.	2	4	6	6	4	4
1	1	3	5	5	5	3
3	3	2	4	5	6	3
2	2	4	6	4	5	3
2	2	3	7	6	5	2
3	3	3	6	7	4	3
1	1	2	5	6	5	4
2	2	4	6	5	4	3
2	2	3	5	5	6	2
2	<u>2</u>	<u>4</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>5</u>	<u>3</u>
Total	20	37	56	54	47	30
Porcentaje de recuperación.	100%	100%	56%	54%	47%	30%

* 6 del ratón "1" se infectó con 10 metacercarias de 5 días de edad.

IV.2.2.3. Determinación de la carga parasitaria.

Tabla N°. 10

Sobrevivencia e infección por Fasciola hepática, en relación a la carga parasitaria (número de metacercarias de 15 a 45 días de edad) en ratón blanco Mus musculus (NIH).

	Infección con (n) metacercarias.					
	n=2	n=4	n=6	n=8	n=10	n=12
Número de Fasciolas	1	1	3	4	5	6
Adultas oñ	1	2	2	3	5	5
tenidas en	2	1	3	3	4	5
cada ratón.	1	3	2	4	6	7
	0	1	2	3	5	5
	1	2	3	5	5	5
	1	2	3	4	7	5
	2	1	4	4	5	6
	1	2	2	3	5	4

IV.2.2.3.- Los resultados de las pruebas de actividad antihelmín-
tica contra Fasciola hepática del 3,5-difenilisoazol,
Troday y Bilevon en las fases aguda y crónica de la in-
fección, administrados por diferentes vías: Intraperi-
toneal, Oral y Subcutánea, a ratones albinos en dife-
rentes dosis, son expresados en las siguientes tablas:
3,5-difenilisoazol.- 11-14, 18-21, 25-28, 32-35 y 39-
42.

Trodax (Nitroxinil).- 43-45, 50 y 51.

Bilevon (Meniclofolan).- 46-49, 52 y 53.

Los resultados de las pruebas de toxicidad del 3,5-di-
fenilisoazol administrado por diferentes vías y en di-
ferentes dosis a ratones albinos, están expresados en
las siguientes tablas.- 17, 24, 31 y 38.

Los resultados de los lotes testigo para el control de
la infección, están expresados en las siguientes tablas:
16, 23, 30, 37 y 54.

Los resultados de los lotes testigo para el control del
disolvente, están expresados en las siguientes tablas:
15, 22, 29 y 36.

NOTA: Los lotes: 1,2,3,11,12,13,21,22,23,31,32,41,42,43 y 60
fueron utilizados como testigos durante los bioensayos.

PRODUCTO: 3,5-difenilisoaxazol en Aceite de Ajónjolí.	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Intraperitoneal	FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda	CONCENTRACION (mg/ml) 7.8125
SOLUCION α SUSPENSION o	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 130.2	LOTE No.4 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	25	3	0	23.1	27.0	Ninguna
2*	22	5	0	25.4	29.0	Infección en los testículos
3	21	4	1	25.8	29.9	Ninguna las metacercarias están en el hígado.
4	14	-	-	26.5	30.5	" " " " " " " " " "
5	7	-	-	27.5	29.3	Pas metacercarias - están pequeñas.
6	20	6	1	27.8	32.2	Ninguna
7	21	1	1	27.8	33.3	Ninguna
8	25	4	0	29.1	33.7	Ninguna
9	26	0	0	29.1	34.3	Daño hepático ?
10	25	6	0	32.0	36.6	Ninguna

PRODUCTO: 3,5-difenilisoxazol en Aceite de Ajonjolí	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION. 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Intraperitoneal	FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda	CONCENTRACION (mg/ml) 3.90
SOLUCION <input checked="" type="radio"/> SUSPENSION <input type="radio"/>	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 6.51	LOTE No. 5 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	25	4	0	20.9	26.3	Ninguna
2	14	-	-	21.0	25.9	Las metacercarias ya están en hígado.
3	22	2	1	21.1	28.5	Ninguna
4	25	3	0	21.3	29.6	Ninguna
5	21	4	0	21.4	30.9	Ninguna
6	23	5	0	22.0	30.3	Ninguna
7	26	0	0	22.2	28.3	Daño hepático ?
8	25	3	0	22.3	31.3	Ninguna
9	25	5	0	23.2	32.6	Ninguna
10	40	-	-	23.9	32.7	No hubo infección ni toxicidad.

PRODUCTO: 3,5-difenilisoxazol en Aceite de Ajonjolí	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Intraperitoneal	FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda	CONCENTRACION (mg/ml) 1.953
SOLUCION ♂ SUSPENSION o	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 32.55	LOTE No. 7 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	14	-	-	24.0	24.7	Las Fasciolas ya están en hígado.
2	21	3	0	25.2	27.3	Ya ha destruido el hígado. Necr. Obs.
3	23	3	1	25.5	30.3	Ninguna
4	25	0	0	26.2	30.6	Daño hepático y hemorragia interna ?
5	26	1	1	26.3	30.9	Ninguna
6	20	5	0	27.0	32.0	Ninguna
7	23	4	0	27.3	32.9	Ninguna
8	26	2	0	27.8	35.5	Ninguna
9	26	3	0	28.4	36.3	Ninguna
10	26	1	2	28.4	38.0	Ninguna

127

PRODUCTO: 3,5-difenilisoazol en Aceite de Ajonjolí	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Intraperitoneal	FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda	CONCENTRACION (mg/ml) 3.90
SOLUCION <input checked="" type="checkbox"/> SUSPENSION <input type="checkbox"/>	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 65.1 3 dosis cada 24 horas	LOTE No. 8 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	2	-	-	20.8	20.3	Ataque de los otros ratones
2	25	4	0	21.6	25.5	Ninguna
3	22	4	0	22.2	28.0	2 Fasciolas se encontraron fuera del hígado.
4	26	3	0	22.3	28.4	Ninguna
5	27	2	0	22.6	28.9	Ninguna
6	25	3	0	23.1	29.5	Ninguna
7	26	1	1	23.1	29.7	Ninguna
8	28	2	0	23.2	30.2	Ninguna
9	30	1	0	24.1	30.4	Ninguna
10	34	0	0	25.0	32.4	Daño hepático. Hemorragia interna.

125

PRODUCTO: aceite de Ajonjolí	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION. 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Intraperitoneal	FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda	CONCENTRACION (mg/ml) 920
SOLUCION <input checked="" type="checkbox"/> SUSPENSION <input type="checkbox"/>	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 15333.33	LOTE No. 6 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	13	-	-	30.5	29.2	Ataque de los demás ratones.
2	5	-	-	30.6	30.4	" " " " " " " " " "
3	22	2	0	31.7	30.6	" " " " " " " " " "
4	17	4	0	30.9	30.8	" " " " " " " " " "
5	25	4	0	32.0	31.2	" " " " " " " " " "
6	26	3	1	33.3	36.0	Ninguna *
7	24	3	0	31.2	30.5	Ataque de los otros ratones
* Las peleas entre ellos provocaron una disminución en el peso, excepto para el líder del grupo.						

130

PRODUCTO: Ninguno	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION -	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Ninguna	FASE DEL TRATAMIENTO : sin tratamiento	CONCENTRACION (mg/ml) cero
SOLUCION o SUSPENSION o	DOSIS (mg/Kg. de Peso) cero	LOTE No. 9 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	20	3	0	23.8	21.3	Ataque de los otros ratones
2	23	4	0	25.6	27.2	Ninguna
3	24	2	0	26.0	28.2	Ninguna
4	23	5	0	27.2	28.4	Ninguna
5	23	4	0	28.5	28.4	Ninguna
6	28	4	0	30.4	28.8	Ninguna
7	23	3	0	30.9	30.0	Ninguna
8	24	2	0	31.1	32.4	Ninguna
9	24	2	1	32.0	32.8	Ninguna
10	34	3	0	32.0	37.0	Ninguna

P R O D U C T O :				VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA RATON	
3,5-difenilborazol en aceite de ajonjolí				0.5 ml.	
VIA DE ADMINISTRACION :				SOLUCION	
Intra peritoneal				SUSPENSION	
				Lote N° 10	
Ratón No.	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Concentración (mg/ml)	Dosis (mg/Kg)	OBSERVACIONES
1	33.3	35.8	125	2083	no se
2	30.2	34.1	62.5	1041.6	observó ningún
3	27.5	30.3	31.25	520.8	síntoma ni de lo
4	24.2	27.3	15.625	260.4	sobre los órganos
5	26.0	30.0	7.8125	130.20	principales.
6	24.0	-	3.906	65.1	
7	21.4	23.8	1.953	32.55	
8	26.0	29.6	0.976	16.27	
9	28.7	31.3	0.488	8.13	
10	22.7	26.1	0.0	0.0	

100

100

PRODUCTO: 3,5-difenilisoaxazol en - Aceite de Ajonjolí	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION. 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Oral	FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda	CONCENTRACION (mg/ml) 7.8125
SOLUCION x SUSPENSION o	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 130.2	LOTE No. 14 Infección con 12 metacer- carias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	21	3	0	23.4	24.6	Diarrea después de
2	22	2	0	24.2	25.0	la administración,
3	25	2	1	25.3	26.2	hasta las 48 horas
4	24	1	1	24.0	24.9	aproximadamente
5	21	4	0	26.1	27.2	" " " " " " " " " "
6	25	3	0	25.7	26.5	" " " " " " " " " "
7	26	3	0	24.3	24.9	" " " " " " " " " "
8	25	4	0	22.9	24.3	" " " " " " " " " "
9	22	3	1	23.8	25.5	" " " " " " " " " "
10	22	3	1	23.8	25.5	Dos fasciolas vivas fuera del hígado.

157

PRODUCTO: 3,5-difenilisoaxazol en - Aceite de Ajonjolí	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Oral	FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda	CONCENTRACION (mg/ml) 3.90
SOLUCION α SUSPENSION o	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 65.1	LOTE No. 15 Infección con 12 metacer- carias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	7	-	-	24.7	25.1	Las metacercarias - están muy pequeñas.
2	21	3	1	25.2	27.0	Ninguna Diarrea
3	25	3	0	26.3	27.4	Ninguna después
4	26	4	0	27.1	29.5	Ninguna de la
5	22	4	1	26.8	28.3	Ninguna administración
6	14	-	-	25.9	26.9	Las metacercarias ya están en el hígado.
7	20	2	0	26.3	28.5	Ninguna Diarrea
8	25	3	0	26.7	29.8	Ninguna después
9	25	4	0	25.4	27.3	Ninguna de la
10	25	3	1	26.8	30.0	Ninguna administración

PRODUCTO: 3,5-difenilisoaxazol en Aceite de Aioniolí	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Oral	FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda	CONCENTRACION (mg/ml) 1.95
SOLUCION ☒ SUSPENSION o	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 32.55	LOTE No. 16 Infección con 12 metacer- carias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	25	3	0	23.2	26.3	Diarrea después de
2	26	2	0	24.1	27.0	la administración.
3	21	1	2	23.8	27.2	" " " " " " " " " "
4	24	3	0	23.6	26.9	" " " " " " " " " "
5	25	2	1	23.6	27.4	" " " " " " " " " "
6	27	2	0	23.7	26.3	" " " " " " " " " "
7	25	4	1	23.9	26.6	" " " " " " " " " "
8	21	3	0	24.5	27.2	" " " " " " " " " "
9	22	3	1	22.9	25.0	" " " " " " " " " "
10	25	0	0	23.1	26.2	Daño hepático fascio- lar ?

135

PRODUCTO: 3,5-difenilisoxazol en aceite de Ajonjolí	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Oral	FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda	CONCENTRACION (mg/ml) 3.90
SOLUCION ♂ SUSPENSION o	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 65.1 3 dosis cada 24 horas	LOTE No. 17 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	25	3	0	26.3	29.1	Ninguna
2	26	3	1	25.0	27.0	Ninguna
3	25	2	1	28.0	30.7	Ninguna
4	14	-	-	27.1	28.0	Exposición al agua - tratamiento
5	22	4	0	26.5	29.2	Ninguna
6	21	3	0	27.6	29.0	Ninguna
7	25	4	0	25.9	28.3	Ninguna
8	27	2	0	27.5	29.9	Ninguna
9	25	4	1	28.1	31.2	Ninguna
10	26	3	0	27.9	30.5	Ninguna

PRODUCTO: Lacta - Jentolif	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Oral	FASE DEL TRATAMIENTO : Lacta	CONCENTRACION (mg/ml) 970
SOLUCION o SUSPENSION o	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 15333.33	LOTE No. 18 Infección con 12 metacer- carias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	21	5	0	25.2	26.8	Diarrea después de
2	22	4	0	26.1	28.3	1. Inmediata ción
3	22	5	1	25.8	27.9	" " " " " " " " " "
4	21	5	0	25.6	27.2	" " " " " " " " " "
5	21	3	0	26.0	28.2	" " " " " " " " " "
6	25	3	0	25.7	27.4	" " " " " " " " " "
7	21	4	0	26.3	28.0	" " " " " " " " " "
8	21	5	0	25.9	28.4	" " " " " " " " " "
9	22	4	0	25.0	28.1	" " " " " " " " " "
10	21	5	0	25.5	28.6	" " " " " " " " " "

137

PRODUCTO: Ninguno		DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION -		VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5		
VIA DE ADMINISTRACION: Ninguna		FASE DEL TRATAMIENTO : -		CONCENTRACION (mg/ml) cero		
SOLUCION o SUSPENSION o		DOSIS (mg/Kg. de Peso) cero		LOTE No. 19 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	25	4	1	30.2	31.8	Ninguna
2	27	3	0	29.9	31.7	Ninguna
3	24	4	0	30.5	32.8	Ninguna
4	22	5	0	31.2	33.1	Ninguna
5	25	4	0	30.8	33.0	Ninguna
6	26	4	0	31.5	33.8	Ninguna
7	25	3	0	30.2	32.7	Ninguna
8	21	5	0	30.7	33.2	Ninguna
9	24	4	0	31.3	34.1	Ninguna
10	25	3	0	30.5	33.4	Ninguna

TABLA Nº 24

P R O D U C T O : 3,5-difenilisoaxazol en aceite de ajonjolí				VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA RATON 0.5 ml.	
VIA DE ADMINISTRACION : Oral				SOLUCION X SUSPENSION 0 Lote Nº 20	
Ratón No.	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Concentración (mg/ml)	Dosis (mg/Kg)	OBSERVACIONES
1	27.2	28.0	125	2083	Todos los ratones
2	26.9	28.1	62.5	1041.6	tuvieron diarrea
3	26.5	27.7	31.25	520.8	después de la -
4	26.6	27.5	15.625	250.4	administración
5	26.7	27.9	7.8125	130.2	pero no se obser
6	27.3	28.8	3.906	65.1	vó ningún síntoma
7	27.3	28.5	1.953	32.55	ni debió sobre los
8	26.8	28.0	0.976	16.27	ordenos principales
9	26.6	28.1	0.488	8.13	
10	26.3	27.9	0.0 control	0.0	

3	22	5	0	29.1	33.6
4	20	5	0	32.0	34.6
5	21	2	1	24.7	28.5
6	14	-	-	26.3	30.3
7	25	4	0	25.8	29.3
8	26	3	1	29.1	34.0
9	25	-	-	26.7	30.7
10	24	4	0	26.9	29.4

PRODUCTO: 3,5-difenilisoaxazol en solución salina Isotónica		DÍA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION 15		VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5		
VIA DE ADMINISTRACION: Intraperitoneal		FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda		CONCENTRACION (mg/ml) 3.90		
SOLUCION o SUSPENSION x		DOSIS (mg/Kg. de Peso) 65.1		LOTE No. 25 Infección con 12 metacer carias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			

PRODUCTO: 3,5-difenilisoaxazol en solución salina Isotónica	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Intraperitoneal	FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda	CONCENTRACION (mg/ml) 1.95
SOLUCION o SUSPENSION x	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 32.55	LOTE No. 26 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	22	3	0	25.7	26.0	Ataque de los otros ratones
2	21	4	0	25.5	26.3	Infección en los - testiculos.
3	23	3	1	26.1	26.8	Ataque de los otros ratones
4	20	5	0	25.8	27.0	Ataque de los otros ratones.
5	25	3	0	26.3	29.0	Ninguna
6	24	3	0	26.0	26.8	Infección en los - testiculos.
7	25	3	1	25.3	26.2	Infección en los - testiculos.
8	22	4	0	25.6	26.0	Ataque de los otros ratones.
9	23	3	0	25.7	26.5	Infección en los - testiculos.
10	21	1	1	24.8	25.8	Ataque de los otros ratones.

VIA DE ADMINISTRACION: Intraperitoneal		FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda		CONCENTRACION (mg/ml) 3.90		
SOLUCION o SUSPENSION g		DOSIS (mg/Kg. de Peso) 65.1 3 dosis cada 24 horas		LOTE No. 27 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	25	3	0	30.2	32.6	Ninguna

PRODUCTO: Solución salina Isotónica (cloruro de sodio)	DIA DEL TRATAMIENTO POST_INFECCION 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Intraperitoneal	FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda	CONCENTRACION (mg/ml) 8.5
SOLUCION x SUSPENSION o	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 141.66	LOTE No. 28 Infección con 12 metacer carias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	25	4	0	29.2	31.8	Ninguna
2	26	4	1	30.4	32.7	Todos los ratones
3	24	4	0	30.6	32.5	
4	26	3	1	30.8	33.0	presentaron daño
5	25	4	0	33.0	36.3	
6	24	4	0	29.6	32.9	hepático y hemo -

PRODUCTO: Ninguno	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Ninguna	FASE DEL TRATAMIENTO : sin tratamiento	CONCENTRACION (mg/ml) cero
SOLUCION o SUSPENSION o	DOSIS (mg/Kg. de Peso) cero	LOTE No. 29 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	24	2	0	24.9	27.4	En todos los casos
2	25	4	0	26.8	30.2	
3	21		0	27.2	30.0	se presentó daño
4	23	5	0	29.4	31.8	
5	28	3	0	25.6	28.3	hepático y hemorra
6	25	4	0	30.2	33.6	
7	24	3	0	27.4	30.5	gia interna debido
8	26	4	0	26.9	29.8	
9	25	2	1	28.5	31.7	1. Fasciolosis
10	27	3	0	31.3	25.3	

TABLA N° 31

P R O D U C T O : 3,5-difenilisoaxazol en solución salina - Isotónica.				VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA RATON 0.5 ml.	
VIA DE ADMINISTRACION : Intraperitoneal				SOLUCION 0 SUSPENSION 0 Lote N° 30	
Ratón No.	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Concentración (mg/ml)	Dosis (mg/Kg)	OBSERVACIONES
1	25.8	28.1	125	2083	No se
2	27.0	29.4	62.5	1041.6	
3	24.3	27.0	31.25	520.8	observó ningún
4	26.2	28.3	15.625	260.4	
5	26.6	29.1	7.8125	130.2	síntoma ni daño
6	27.8	30.6	3.906	65.1	
7	25.4	27.5	1.953	32.55	sobre los órganos
8	29.1	31.4	0.976	16.27	
9	27.2	29.5	0.488	8.13	principales
10	26.7	28.8	0.0 solvante	0.0	

PRODUCTO: 3,5-difenilisonaxazol en solución salina Isotónica	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION. 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Intraperitoneal	FASE DEL TRATAMIENTO : aguda	CONCENTRACION (mg/ml) 7.8125
SOLUCION o SUSPENSION e	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 130.2	LOTE No. 34 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	25	4	0	35.2	39.4	Ninguna
2	22	3	0	36.2	38.1	Ninguna
3	21	3	0	33.3	36.7	Ninguna
4	14	-	-	34.2	36.0	Las metacercarias y están en hígado.
5	24	4	0	34.7	37.5	Ninguna
6	25	3	0	32.6	35.4	Ninguna
7	25	4	0	33.8	37.2	Ninguna
8	23	3	0	34.5	37.4	Ninguna
9	21	2	0	33.0	36.7	Ninguna
10	25	4	0	35.2	38.6	Ninguna

14

TABLA N° 33

PRODUCTO: 3,5-difenilisoaxazol en solución salina Isotónica		DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION. 15		VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5		
VIA DE ADMINISTRACION: Oral		FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda		CONCENTRACION (mg/ml) 3.90		
SOLUCION o SUSPENSION ☒		DOSIS (mg/Kg. de Peso) 65.1		LOTE No. 35 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	25	2	0	31.3	34.2	Ninguna
2	35	0	0	29.9	35.4	No hubo infección ni toxicidad
3	24	3	0	27.3	29.8	
4	27	0	0	30.1	32.5	Hígado lesionado, hemorragia interna?
5	22	4	0	29.6	32.8	Ninguna
6	21	3	0	30.4	33.2	Hepatomegalia
7	23	2	0	28.8	30.5	Ninguna
8	26	3	0	29.4	33.0	Conductos biliares con colangitis.
9	25	4	0	30.2	32.7	Ninguna
10	24	5	0	29.7	32.6	Ninguna

14/8

SOLUCION o
SUSPENSION α

DOSIS (mg/Kg. de Peso)
32.55

LOTE No. 36
Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			

SOLUCION o SUSPENSION x		DOSIS (mg/Kg. de Peso) 65.1 3 dosis cada 24 horas		LOTE No. 37 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			

PRODUCTO: Solución salina Isotónica (Cloruro de Sodio)	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION. 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Oral	FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda	CONCENTRACION (mg/ml) 8.5
SOLUCION α SUSPENSION o	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 141.66	LOTE No. 38 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	25	3	0	23.8	26.5	En todos los casos
2	24	3	0	24.1	26.8	
3	23	4	0	23.6	26.3	se presentó daño he-
4	22	2	0	23.7	25.5	
5	25	3	0	24.5	26.1	oftálmico y hemorragia
6	21	3	0	23.8	25.2	
7	24	4	0	24.0	26.0	interna debido a la
8	25	3	0	24.8	27.3	
9	26	3	0	25.4	29.2	Parasitológico
10	25	3	0	24.3	26.5	

PRODUCTO: Ninguno		DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION. 15		VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5		
VIA DE ADMINISTRACION: Ninguna		FASE DEL TRATAMIENTO : Sin tratamiento		CONCENTRACION (mg/ml) cero		
SOLUCION o SUSPENSION o		DOSIS (mg/Kg. de Peso) cero		LOTE No. 39 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	24	3	0	27.2	29.4	En todos los casos
2	22	2	0	25.8	27.8	
3	25	3	0	26.3	28.1	se presentó daño he-
4	26	4	0	24.7	26.6	
5	21	2	0	27.8	29.4	nético y hemorragia
6	25	5	0	23.1	25.6	
7	23	4	0	28.3	30.0	interna debida a la
8	22	3	0	29.2	32.8	
9	24	3	0	26.7	27.9	2 fasciolas
10	25	4	0	25.8	28.0	

TABLA N° 38

P R O D U C T O : 3,5-difenilisoxazol en solución salina Isotónica				VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA RATON 0.5 ml.	
VIA DE ADMINISTRACION : Oral				SOLUCION 0 SUSPENSION 0 Lote N° 40	
Ratón No.	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Concentración (mg/ml)	Dosis (mg/Kg)	OBSERVACIONES
1	30.2	32.8	125	2083	No se
2	31.3	33.7	62.5	1041.5	
3	29.8	32.7	31.25	520.8	observó ningún
4	26.3	29.0	15.625	260.4	
5	26.0	28.5	7.8125	130.2	síntoma ni daño
6	25.0	27.4	3.906	65.1	
7	24.7	26.9	1.953	32.55	sobre los órganos
8	27.0	29.8	0.976	16.27	
9	26.2	28.5	0.488	8.13	principales
10	25.4	27.5	0.0 sol. tiente	0.0	

155

PRODUCTO: 3,5-difeniloxazol en acei te de ajonjolí		DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION. 35		VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5		
VIA DE ADMINISTRACION: Intraperitoneal		FASE DEL TRATAMIENTO : Crónica		CONCENTRACION (mg/ml) 7.8125		
SOLUCION α SUSPENSION o		DOSIS (mg/Kg. de Peso) 130.2		LOTE No. 44 Infección con 6 metacer carias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	38	2	0	25.2	28.7	El hígado
2	40	1	1	26.1	29.3	y está -
3	36	1	0	26.2	29.2	electrizado
4	38	0	0	26.0	30.4	pero los con
5	42	0	0	25.8	28.7	ductos bilia
6	37	1	0	26.8	30.5	nos están in
7	39	1	0	25.7	28.4	flameado
De 10 ratones que formaban parte de este lote solo llegaron 7 a la						
fase crónica.						

154

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)
		Vivas	Muertas		
1	39	1	0	29.3	33.7
2	38	1	0	28.8	32.0
3	40	1	0	29.4	33.5
4	36	2	0	28.7	33.1
5	37	1	0	27.9	32.2

LABOR N° 41

PRODUCTO: 3,5-difenilisoaxazol en solución Alcohólica		DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION 35		VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5			
VIA DE ADMINISTRACION: Subcutánea		FASE DEL TRATAMIENTO : crónica		CONCENTRACION (mg/ml) 6			
SOLUCION o SUSPENSION x		DOSIS (mg/Kg. de Peso) 100		LOTE No. 46 Infección con 6 metacercarias a cada/ratón.			
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones	
		Vivas	Muertas				
1	37	2	0	27.4	29.9	En 5 de los 8 casos se presentó inflamación de los conductos biliares.	
2	38	1	0	26.3	30.4		
3	40	1	1	29.2	33.2		
4	39	1	0	30.1	33.7		
5	39	1	0	28.7	32.3		
6	42	0	1	26.5	30.9		Hígado cicatrizado no hay inflamación en conductos biliares.
7	41	1	1	27.2	30.8		
8	40	1	0	28.3	31.8		
De los 20 ratones que formaban el lote solo 8 llegaron a la fase crónica.							

TABLA N° 42

PRODUCTO: 3,5-difenilisoaxazol en solución Alcohólica		DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION 35		VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5		
VIA DE ADMINISTRACION: Oral		FASE DEL TRATAMIENTO : crónica		CONCENTRACION (mg/ml) 6		
SOLUCION o SUSPENSION x		DOSIS (mg/Kg. de Peso) 100		LOTE No. 47 Infección con 6 metacercarias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	40	1	1	30.7	34.2	Hígado cicatrizado
2	42	0	1	28.3	31.7	no hay inflamación
3	41	0	1	27.2	30.5	en conductos bilia
4	39	2	0	29.1	31.8	res en el 50% de
5	40	1	0	28.4	31.4	los casos
6	38	2	0	30.2	33.5	
De los 20 ratones que formaban este lote, solo llegaron 6 a la fase crónica.						

PRODUCTO: Trodat	DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION: 15	VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5
VIA DE ADMINISTRACION: Subcutánea	FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda	CONCENTRACION (mg/ml) 0.85 mg
SOLUCION α SUSPENSION o	DOSIS (mg/Kg. de Peso) 14.166	LOTE No. 48 Infección con 12 metacer carias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	25	5	0	25.2	27.8	La administración
2	24	4	0	25.7	27.7	produce irritación
3	25	3	0	26.1	28.3	en todos los casos
4	21	2	0	25.8	28.0	se presentó hemo
5	23	3	0	25.4	28.7	hepático y hemo -
6	27	4	1	26.7	29.2	rrragio interno -
7	26	5	0	26.2	28.3	debida a la -
8	25	4	0	25.5	27.4	Fasciolosis
9	25	3	0	25.3	26.9	
10	24	3	0	26.4	30.3	

157

TABLA N° 44

PRODUCTO:		DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION.		VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml)		
Trodox		15		0.5		
VIA DE ADMINISTRACION:		FASE DEL TRATAMIENTO :		CONCENTRACION (mg/ml)		
Oral		Aguda		0.85		
SOLUCION ☒ SUSPENSION o		DOSIS (mg/Kg. de Peso)		LOTE No.49 Infección con 12 metacer- carias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	24	3	0	30.2	32.7	En todos los casos
2	21	2	0	31.8	34.5	se presentó daño -
3	27	6	0	29.7	33.4	hepático y hemorra-
4	25	4	0	30.5	32.8	gia interna debido
5	24	5	0	31.1	33.3	a la fasciolasis
6	23	4	0	30.7	33.1	
7	25	5	0	30.6	33.7	
8	22	7	1	30.4	32.9	
9	21	4	0	28.8	32.3	Necropsia de Obser- vación.
10	14	-	-	30.3	31.7	Las fasciolas ya están en hígado.

159

TABLA N° 45

PRODUCTO:		DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION		VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml)		
Trodox		15		0.5		
VIA DE ADMINISTRACION:		FASE DEL TRATAMIENTO :		CONCENTRACION (mg/ml)		
Subcutánea		Aguda		6.8		
SOLUCION ♂		DOSIS (mg/Kg. de Peso)		LOTE No. 50		
SUSPENSION o		113.333		Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	24	3	0	24.1	26.2	
2	15	-	-	23.2	24.0	Murió en el momento de la administración
3	25	5	0	23.8	26.3	
4	23	4	0	22.9	25.7	Todos los casos -
5	25	4	0	25.3	27.9	presentación de
6	22	3	0	26.8	29.3	hepático y hemorra-
7	21	2	0	24.7	26.6	gia interna debido
8	24	3	1	23.6	25.8	a la fasciolosis
9	25	4	0	25.1	27.9	
10	25	4	1	24.6	27.0	

140

TABLA N° 46

PRODUCTO: Bilevon		DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION 15		VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5		
VIA DE ADMINISTRACION: subcutánea		FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda		CONCENTRACION (mg/ml) 0.4		
SOLUCION 6 SUSPENSION 0		DOSIS (mg/Kg. de Peso) 6.666		LOTE No. 51 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	21	5	0	24.0	30.7	En todos los casos
2	26	7	0	23.2	25.0	se presentó daño
3	21	4	0	22.2	25.3	hepático y hemorra
4	24	5	0	21.2	25.2	gia interna debido
5	28	6	0	23.8	26.1	a la fasciolosis
6	23	4	0	24.5	27.8	
7	25	3	0	26.2	29.4	
8	26	6	0	24.7	27.6	
9	24	5	0	23.6	25.4	
10	25	4	0	22.9	26.3	

TABLA N° 47

PRODUCTO:		DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION		VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml)		
Bilevon		15		0.5		
VIA DE ADMINISTRACION:		FASE DEL TRATAMIENTO :		CONCENTRACION (mg/ml)		
Oral		Aguda		0.4		
SOLUCION <input checked="" type="checkbox"/>		DOSIS (mg/Kg. de Peso)		LOTE No. 52		
SUSPENSION <input type="checkbox"/>		6.666		Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			

TABLA N° 48

PRODUCTO: Bilevon		DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION. 15		VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5		
VIA DE ADMINISTRACION: Subcutánea		FASE DEL TRATAMIENTO : Aguda		CONCENTRACION (mg/ml) 0.3		
SOLUCION ♂ SUSPENSION o		DOSIS (mg/Kg. de Peso) 13.333		LOTE No. 53 Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	28	4	0	25.8	26.9	Daño hepático
2	28	3	0	23.2	25.7	hemorragia interna
3	29	3	0	24.2	28.3	Conductos biliares inflamados.
4	28	5	0	29.1	31.6	Daño hepático y
5	26	4	0	27.4	32.0	hemorragia interna
6	21	3	0	29.6	36.0	neecropsia de Observación
7	26	3	0	31.0	36.6	Dos fasciolas en el conducto biliar y una en hígado.
8	22	2	0	29.6	30.4	
9	25	4	0	30.4	34.7	Daño hepático y
10	24	3	0	28.7	31.9	hemorragia interna

SOLUCION	o	DOSIS (mg/Kg. de Peso)	LOTE No. 54
SUSPENSION	Q	25	Infección con 12 metacercarias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	15	0	-	37.3	38.5	Todos los ratones

SOLUCION α	DOSIS (mg/Kg. de Peso)	LOTE No. 55
SUSPENSION o	113.333	Infección con 6 metacercarias a cada/ratón.

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			

Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
Vivas	Muertas			
4	0	27.3	31.1	Hígado duro y delgado
3	0	25.5	28.6	Venícula y conductos biliares inflamados. Hígado verde.
7	0	26.6	30.2	Hígado pequeño y duro
5	0	27.4	29.8	Venícula y conductos biliares inflamados
5	0	28.9	33.4	Conductos biliares e inflamados por las fcs

Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	49	-	-	29.2	33.4	No se encontraron Fasciolas
2	49	-	-	27.6	32.8	Hígado cicatrizado
3	43	3	2	28.3	33.7	Vesícula y conducto biliares inflamados

TABLA N° 53

PRODUCTO: Bilevon		DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION. 35		VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml) 0.5		
VIA DE ADMINISTRACION: Oral		FASE DEL TRATAMIENTO : crónica		CONCENTRACION (mg/ml) 0.8		
SOLUCION ♂ SUSPENSION o		DOSIS (mg/Kg. de Peso) 13.333		LOTE No. 58 Infección con 6 metacercarias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	40	7	0	31.2	34.3	Vesícula y conductos biliares inflamados
2	42	5	0	34.3	36.7	biliares inflamados
3	45	3	1	29.8	35.2	no se encontraron fasciolas
4	41	6	0	30.4	36.1	Vesícula y conductos biliares inflamados
5	49	-	-	31.7	37.4	No se encontraron fasciolas
De los 20 ratones que formaban este lote solo llegaron 5 a la fase crónica.						

391

TABLA N° 54

PRODUCTO:		DIA DEL TRATAMIENTO POST-INFECCION.		VOLUMEN ADMINISTRADO A CADA / RATON (ml)		
Ninguno		-		0.5		
VIA DE ADMINISTRACION:		FASE DEL TRATAMIENTO :		CONCENTRACION (mg/ml)		
Ninguna		Sin tratamiento		cero		
SOLUCION o SUSPENSION o		DOSIS (mg/Kg. de Peso)		LOTE No. 59		
		cero		Infección con 6 metacercarias a cada/ratón.		
Ratón #	Día de la Muerte	Fasciolas Recuperadas		Peso Inicial (gramos)	Peso Final (gramos)	Observaciones
		Vivas	Muertas			
1	35	4	0	27.2	32.3	Hígado pequeño
2	46	3	0	31.4	34.8	
3	49	3	0	28.9	32.5	Conductos biliares
4	49	2	0	25.2	30.8	inflamados
5	56	0	0	30.3	37.6	No hay infección ni toxicidad.
De los 20 ratones que formaban parte de este lote solo 5 llegaron a la fase crónica.						

169

TABLA N° 56

1 ml de muestra + 1 ml de solución reguladora de fosfato dibásico 0.5 molas. + 1 ml de la solución clorofórmica del patrón interno.

Mezclar un minuto

Centrifugar 10 minutos a 1000 rpm

Fase clorofórmica

Fase acuosa + 1 ml de solución clorofórmica del patrón interno

Mezclar un minuto

Centrifugar 10 minutos a 1000 rpm

Fase clorofórmica

Desechar fase acuosa

Evaporar un mililitro

Reconstruir con 40 μ l de cloroformo

Inyectar 1 μ l al cromatógrafo.

Procedimiento general para cuantificar el 3,5-Difenilisoaxazol en orina, heces y solución serosal.

Cantidad excretada del 3,5-difenilisoazol en orina, después

de la administración intraperitoneal de diferentes dosis en

suspensión acuosa y en solución oleosa.

Formulación	Nº ratón	Dosis (mg/kg)	Microgramos excretados en orina	
			48 hrs.	72 hrs.
Suspensión Acuosa	1	7.8		-
	2	15.6		2.3
	3	31.2		2.97
	4	62.5		12.4
	5	31.2	-	
	6	31.2	1.1	
	7	31.2	-	
Solución Oleosa	8	-	-	
	13	7.8		0.69
	14	15.6		3.2
	15	31.2		6.7
	16	62.5		14.0
	17	31.2	1.3	
	18	31.2	1.0	
	19	31.2	2.5	
20	-	-		

Cantidad excretada del 3,5-difenilisoaxazol en heces, después de la administración intraperitoneal de una dosis de 31.2 mg/kg en suspensión acuosa y en solución oleosa.

Formulación	No. Ratón	Microgramos excretados del 3,5-difenilisoaxazol en heces. 72 horas
Suspensión Acuosa	9	761.5
	10	872.9
	11	623.6
	12	testigo
		752.7
		101.1
Solución Oleosa	21	833.7
	22	780.4
	23	794.6
	24	testigo
		801.9
		21.6

Microgramos transferidos del 3,5-difenilisoaxazol en segmentos

de 10 centímetros de la porción del yeyuno del intestino in -

vertido de rata.

Concentración inicial (mcg/ml).	Nº. Esp.	mcg transferidos del 3,5-difenilisoaxazol en 100 min.	Coefficiente de permeabilidad. (ml/min)
4.12	4	0.506	0.0012 \pm 0.0008

TABLA N° 60

Microgramos transferidos acumulados de Diazepan en segmentos

de 10 cm de la porción del yeyuno del intestino invertido de

rata $C_0 = 100$ mcg/ml.

Tiempo	mcg transferidos	mcg transferidos acumulados	mcg transferidos acumulados/ C_0
20	7.5	7.5	0.075
40	11.4	18.9	0.189
60	12.3	31.2	0.312
80	12.0	43.2	0.432
100	16.5	59.7	0.597

V.- DISCUSION Y CONCLUSIONES.

V.1.- Discusión.

V.1.1.- Síntesis de 3-(etoxicarbonilmetil)-5-fenilisoxazol y 3-(2-fenil-2-oxoetil)-5-isoxazolona.

Inicialmente se escogió esta vía de síntesis debido a la facilidad de contar con los reactivos y a la supuesta sencillez en las reacciones de preparación de los productos, sin embargo la separación de la mezcla de reacción fue difícil y se complicó la purificación de los componentes, lo que provocó un cambio en la vía de síntesis.

V.1.2.- Síntesis del 3,5-difenilisoxazol.

Para preparar este derivado del isoxazol es necesario sintetizar al dibenzoilmetano (1,3-difenil-1,3-propanodiona), el cual es un producto intermediario indispensable en la obtención del producto final.

Al realizar las primeras reacciones utilizando hidruro de sodio para formar el anión de la acetofenona, se esperaba que este último condensara con el cloruro de benzoilo para dar el dibenzoilmetano, sin obtener este producto intermediario, se puede pensar en dos opciones: el hidruro de sodio utilizado no funciona o bien las condiciones de la reacción (temperatura, concentración de reactivos, etc) no son las adecuadas, por lo que no se obtuvo el producto deseado. Lo anterior propició la preparación del dibenzoilmetano a la manera tradicional, a partir de acetofenona y benzoato de etilo utilizando etóxido de sodio para formar el anión de la acetofenona. Una vez obtenido el dibenzoilmetano, la reacción con el clorhidrato de hidroxilamina da un alto rendimiento del producto final 3,5-difenilisoxazol.

V.1.3.- Síntesis del 1-(3,4,5-trimetoxifenil)-3-fenil-1,3-propanodiona.

Para preparar este compuesto se trató de seguir la misma vía

de síntesis utilizada en la obtención del 3,5-difenilisoaxazol, sustituyendo exclusivamente a la acetofenona por la 3, 4, 5-trimetoxiacetofenona (reactivo de importación en cantidad limitada). Después de llevar a cabo la reacción se obtuvo una mezcla de productos y reactivos, de alta viscosidad difícil de separar lo que, aunado a la falta de reactivos para realizar varias repeticiones, propició la suspensión del proceso de obtención del producto.

V.1.4.- Síntesis del Dibenzoilmetano (1, 3-difenil-1,3-propanodiona) por otra vía, para mejorar la síntesis del 3,5-difenilisoaxazol, a través de la preparación de Benzoil acetato de etilo y dibenzoil acetato de etilo, se tiene otra alternativa pero no se recomienda, porque la ruta es más complicada y requiere de un gasto mayor en reactivos. Además no se incrementa el rendimiento en la obtención del dibenzoilmetano.

V.1.5.- Pruebas de Toxicidad.

Las tablas No. 7 y 8 muestran claramente que el 3,5-difenilisoaxazol no presenta toxicidad a las dosis en que es administrado.

Además las tablas No. 17, 24, 31 y 38 confirman lo expuesto anteriormente, aunque cabe señalar que esto podría deberse a que este compuesto se absorbe muy lentamente y los niveles del mismo en el torrente circulatorio no son suficientes para provocar reacciones adversas y por lo tanto no se observan síntomas, ni daño aparente.

V.1.6.- Viabilidad de las metacercarias de acuerdo a su edad.

En la tabla N° 9 se muestra la capacidad de las metacercarias (estado infectante del hospedero definitivo) para producir la Fasciolosis, en relación a

V.1.7.- Carga Parasitaria.

La tabla N° 10 se utiliza para determinar el número de metacercarias que se deben administrar a cada ratón para producir la Fascioliasis, dependiendo de los intereses del investigador y del bioensayo en cuestión. Se puede observar que el porcentaje de recuperación de Fasciolas es directamente proporcional al número de metacercarias administradas.

También se determina el porcentaje de mortalidad en ambas fases de la infección: aguda y crónica, lo cual es importante en el momento de planear un experimento ya que se observa que cuando las Fasciolas están solas, al no tener competencia por el espacio y el alimento se desarrollan rápidamente y en la mayoría de los casos provocan la muerte del huésped en la fase aguda.

Este fenómeno no se presenta cuando hay más de una fasciola en el hígado, sin embargo al incrementarse el número de Fasciolas aumenta el daño ocasionado y también el porcentaje de mortalidad en la fase aguda.

Debido a que nuestro objetivo es determinar la actividad antihelmíntica de compuestos orgánicos se decidió utilizar una carga parasitaria de 12 metacercarias que nos dieran un 50% de recuperación de Fasciolas para poder observar claramente los resultados cuando se aplica el tratamiento en la fase aguda y una carga parasitaria de 6 metacercarias lo cual permite que un 30% de los huéspedes infectados lleguen a la fase crónica, obteniendo un porcentaje de recuperación del 25% de Fasciolas para poder observar los resultados cuando se aplica el tratamiento en la fase crónica.

Las tablas de resultados demuestran que el 3,5-difeniliso~~xa~~zol no es activo contra Fasciola hepática en solución oleosa o en suspensión acuosa por vías oral e intraperitoneal, administrado en dosis de 130.2, 65.1 y 32.55 mg/kg de peso vivo y 65.1 mg/kg/día durante tres días. Sin embargo la tabla N° 41 indica que cuando es administrado en suspensión alcohólica por vía subcutánea a una dosis de 100 mg/kg de peso, durante la fase crónica, puede presentar alguna actividad parcial contra este parásito, ya que se obtuvieron fasciolas muertas en tres de los ocho animales tratados aunque no podemos asegurar que esto se debe al 3,5-difeniliso~~xa~~zol.

Por otra parte se confirma la actividad de TRODAK y BILAVON (productos comerciales) contra Fasciola hepática en la fase crónica, ya que es sabido que estos compuestos no presentan actividad antihelmíntica en la fase aguda, probablemente estos compuestos intervienen en algún proceso metabólico que solo se da en las fasciolas adultas y no en las jóvenes.

El único producto comercial (Rafoxanida) que es activo en ambas fases: aguda y crónica, no se produce en México y no fue posible realizar bioensayos con el para demostrar su actividad antihelmíntica.

V.1.9.- Estudio de la absorción del 3,5-difeniliso~~xa~~zol.

Este estudio se planteó después de realizar varios bioensayos para demostrar la actividad antihelmíntica del 3,5-difeniliso~~xa~~zol, sin conseguir resultados positivos, lo cual pudiera indicar que la falta de actividad biológica se debe a un proceso de absorción deficiente.

del 3,5-difenilisoaxazol tanto en orina como en heces, es muy pequeña en relación a la dosis administrada. Además se observa que la excreción es mucho mayor en heces que en orina.

Por otra parte se observa que el 3,5-difenilisoaxazol sigue una farmacocinética lineal en los intervalos de dosis (7.8, 15.6, 31.2 y 62.5 mg/kg de peso) administrados en solución oleosa o en suspensión acuosa y la cantidad excretada en orina, ya que los coeficientes de correlación son de 0.99 y 0.96 respectivamente.

V.1.9.2.- Estudio in vitro.

La determinación del coeficiente de permeabilidad es un recurso valioso para predecir las características de absorción de una gran variedad de fármacos, por medio del método del intestino invertido de rata.

En las tablas N° 59 y 60 se demuestran los microgramos de 3,5-difenilisoaxazol y de Diazepam (utilizado como referencia), transferidos al intestino invertido de rata, en 100 minutos con lo cual se calcularon los coeficientes de permeabilidad mediante la ecuación de Fick, que son: $p = 0.0012$ ml/min, para el 3,5-difenilisoaxazol y de $p = 0.006$ ml/min para el Diazepam, lo cual nos permite observar que el coeficiente de permeabilidad es muy pequeño, comparado con el de otros fármacos, lo que indica que el 3,5-difenilisoaxazol presenta problemas de absorción.

V.2.- Conclusiones.

V.2.1.- Síntesis.

En relación a los métodos de síntesis podemos decir que no se realizaron innovaciones en las reacciones de preparación de los productos obtenidos en el laboratorio.

También podemos comentar que los productos obtenidos en las mezclas de reacción fueron difíciles de separar y purificar por los métodos tradicionales (cristalización, diferentes tipos de cromatografía, etc).

El éxito en las reacciones de síntesis se llevó a cabo en la obtención del 3,5-difenilisoaxazol, producto con el cual se realizaron todas las pruebas biológicas.

V.2.2.- Pruebas de Toxicidad.

Los estudios de toxicidad aguda realizados con el 3,5-difenilisoaxazol demuestran que este producto no presenta efectos tóxicos aún a dosis muy altas, lo cual obliga a pensar en un proceso de absorción deficiente debido a la preformulación o a la vía de administración inadecuada, por lo tanto se trató de probar por varias vías de administración (oral, intraperitoneal y subcutánea) y en tres diferentes preformulaciones (solución oleosa, suspensión acuosa y suspensión alcohólica).

V.2.3.- Pruebas para demostrar la actividad biológica.

V.2.3.1.- Ciclo biológico de *Fasciola hepática*.

Se logró desarrollar perfectamente el ciclo de Fasciola hepática en el laboratorio, utilizando caracoles del género Lymnaea como huésped intermediario y ratones albinos (Mus musculus) (NIH) como huésped definitivo. Lo cual nos permite realizar todas las pruebas de eficacia necesarias para demostrar la actividad antihelmíntica de cualquier sustancia.

V.2.3.2.- Pruebas de Eficacia.

Después de realizar un sin número de bioensayos para demostrar la actividad antihelmíntica del 3,5-difenilisoaxazol, podemos concluir, que no es activo contra Fasciola hepática, sin descartar la posibilidad de que pueda ser activo contra otros parásitos, o tal vez contra este mismo, si se encuentra la dosis y se mejora su formulación, incrementándose la absorción del fármaco.

También podemos concluir que Trodax y Bilevon (productos -

En el estudio in vitro se encontró que el 3,5-difenilicoxazol tiene un coeficiente de permeabilidad muy bajo de 0.0012 ± 0.0008 ml/min., lo que indica que presenta problemas de absorción, lo cual se confirma con los resultados del estudio de absorción in vivo. La cantidad excretada del producto en forma inalterada, es mayor en heces que en orina siendo de 803 ± 22.5 y 752 ± 101.0 mcg., a las 72 horas de haber administrado intraperitonealmente una dosis de 31.2 mg/kg en solución oleosa y en suspensión acuosa, respectivamente. Aunque en orina la cantidad excretada es menor, se encontró que existe una relación lineal entre la dosis administrada y la cantidad excretada, lo cual implica procesos cinéticos de primer orden en la absorción, distribución y eliminación del 3,5-difenilicoxazol.

VI.- BIBLIOGRAFIA.

1.- Islip Peter J.

Burger's Medicinal Chemistry

Fourth Edition. Edited by Manfred E. Wolff. A Wiley Interscience Publication.

John Wiley and Sons.

Capítulo 21 Anthelmintic Agents. Vol 2: 481-530
New York (1980).

2.- Huerta Berdeja Ignacio.

"Análogos al Bencimidazol con posible Actividad Antihelmín-
tica".

Tesis: Maestría en Ciencias Químicas.

Farmacia - Química Farmacéutica

Facultad de Química

División de Estudios de Posgrado U.N.A.M.

México (1982).

3.- Levine Ruth R.

Pharmacology: Drug Actions and Reactions.

Second Edition. Little, Brown and Company

Boston (1978).

4.- Ehrlich Centennial

Symposium, Ann. N.Y. Acad. Sci, 59, 141 (1964)

5.- B.R. Baker

Design of Active-Site Directed Enzyme Inhibitors.

The Organic Chemistry of the Enzyme-Active site, Wiley, New
York, (1967).

6.- Alfred Burger

Medicinal Chemistry

Third Edition Part. I

Chapter 23. Anthelmintics

A.S. Tomcufoik and E.M. Hardy: 583-600.

Wiley Interscience (1970).

- 181
- 7.- Faust, E.C.; Russell, P.F. y Lincicome, D.R.
Parasitología Clínica de Craig y Faust.

Second Edition en Español.
Unión Tipográfica.
Editorial Hispano Americana.
México (1961).
- 8.- Burger Alfred.
Burger's Medicinal Chemistry.
Fourth Edition.- The Basis of Medicinal Chemistry
Edited; By Manfred E. Wolff. A Wiley Interscience Publication
John Wiley and Sons
Capítulo Uno.- Introducción: History and Economics of Medicinal Chemistry. 1 - 54.
New York (1980).
- 9.- P. Ehrlich and K. Shiga
Klin Wochenschr., 41; 329 - 362, (1904)
- 10.- D.A. Berberian, E. W. Dennis and C.A. Pipkin . .
Am. J. Trop. Med., 30, 613 (1950)
- 11.- G. Lämmler; H. Herzog, and D. Grüner.
Development of Chemotherapeutics Agents for Parasitic Diseases in M. Marois, Ed., North Holland. Amsterdam (1975) p. 157
- 12.- Mc Farland J.W.
Prog. Drug. Res.; 16: 157 - 193; (1972).
- 13.- A. Davis.
J. Toxicol Environ, Health, 1; 191 (1975).
- 14.- J.B. Christopherson
Lancet, 2; 325, (1918).
- 15.- E.A.H. Friedheim
In International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeu -

27

11/11

tics, Section 64, Vol 1, R. Cavier and F. Hawking
Eds., Pergamon Press
Oxford, 1973 p 29

- 16.- M. Ron Pedrique and N. Ercoli
Bull. W.H.O., 45; 411, (1971).
- 17.- Katz, M.
Drugs.; 13: 124 - 136; Academic Press, (1977).
- 18.- D. Posthuma and W.J. Vaatstra
Biochem Pharmacol., 20; 1133, (1971).
- 19.- A.L. Bartlet
Brit., J. Pharmacol, 58; 395, (1976).
- 20.- M.J. Miller
Reviewed by; Fortschr Arzneimittelforsch; 20; 449, (1976).
- 21.- H. Mauss
Chem. Ber., 81; 19, (1948).
- 22.- S. Archer and A. Yarinsky
Fortschr, Arzneimittelforsch., 16; 11, (1972).
- 23.- P.E. Hartman and P.B. Hulbert
J. Toxicol. Environ. Health; 1; 243, (1975)
Ibid, 329, (1975).
- 24.- P.B. Hulbert; E. Bueding and P.E. Hartman
Science, 186; 647, (1974).
- 25.- L.M. Werbel
Top. Med. Chem., 3; 125, (1970).
- 26.- D.G. Erikson; J.G. Bougeois; E.H. Sadun, and E. Bueding
J. Pharmacol. Exp. Ther., 178; 411, (1971).

27.- M.M. Shahin and B.J. Kilbey
Mutat, Res., 26; 193, (1973).

28.- O.D. Standen
In Experimental Chemotherapy. Vol 1,
R.J. Schinitzer and F. Hawking, Eds.
Academic, Press
New York (1963) p. 701

29.- A. Davis
Drug Treatment in Intestinal Helminthiases. World Health
Organization.
Geneva, 1973, p. 13

30.- J. Del Castillo; W.C. de Mello, and T. Morales.
Brit. J. Pharmacol. Chemother.; 22; 463, (1964).

31.- H.J. Saz, and E. Bueding
Pharmacol, Rev., 18; 871, (1966).

32.- A.D.M. Bryceson, D.A. Warrell, and H.M. Pope
Brit, Med. J., 1; 742, (1977).

33.- M.C. Mac Cowen, M.E. Callender, and M.C. Brandt.
Am. J. Trop. Med. Hyg. 6; 894, (1957).

34.- J.K. Weston, P.E. Thompson, J.W. Reinertson R.A. Fiskens, and
T.F. Reutner.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 107; 315. (1953).

35.- P.J. Islip
Fortschr Arzneimittelfosch., 17; 241, (1973).

36.- W. Flucke, S. Wirtz and H. Feltkamp.
In Veterinary Pesticides, SCI Monograph N° 33, Society of
Chemical Industry.
London, 1969, p. 12.

37.- D.A. Rawes and P.A. Clapham
Vet, Rec; 73; 1755, (1961).

38.- D.S. Pardanani, V.D. Trivedi, L.G. Joshi; et.al.
Ann. Trop. Med. Parasitol., 71; 49, (1977).

39.- J.W. Mc Farland
Fortschr. Arzneimitteiforsch, 16; 157, (1972).

40.- M.H. Fisher, G. Schwartzkopf Jr, and D.R. Hoff.
J. Med. Chem., 15; 1168, (1972).

41.- D.R. Hoff, M.H. Fisher, R.J. Dochis; et.al.
Experientia, 26; 550, (1970).

42.- M.S. Wolfe and J.M. Wershing
J. Am. Med. Assoc., 230; 1408, (1974).

43.- M.J. Miller, I.M. Krupp; et. al.
J. Am. Med. Assoc., 230; 1412, (1974)§

44.- J.P. Brugnans, D.C. Thienpont, I. Van Wijngaarden; et. al.
J. Am. Med. Assoc., 217; 313, (1971).

45.- E.A. Averkin, C.C. Beard, C.A. Dvorak, J.A. Edwards; et. al.
J. Med. Chem., 18; 1164, (1975).

46.- H. Mrozik, H. Jones, J. Friedman, G. Scwartzkopf; et. al.
Experientia, 25; 883, (1969).

47.- A.W. J. Broome, J.P. Cairns, N.S. Crossley; et. al.
Ind. Chim. Belg., 32; (Spec. N°.), 204, (1967).

48.- G.C. Coles and J.M. East.
Unpublished Observations., described by G.C. Coles.
Helminthol. Abstr; 44; 147, (1975).

49.- D. Düwel and H. Metzger

J. Med. Chem., 16; 433, (1973).

50.- J.P. Tollenaere

J. Med. Chem., 16; 791, (1973).

51.- Anonymous

Drug Ther. Bull., 13; 69, (1975).

52.- R. Gönnert, J. Johannis, E. Schraufstaetter and R. Strufe.

Med. Chem. (Leverkusen, Ger.), 7; 540, (1963).

53.- Von H. Ruschig, J. König, Düwel, and H. Loewe.

Arzneim.- Forsch., 23; 1745, (1973).

54.- D. Düwel, Deut.

Tieraeztl. Wochenshr., 77; 97, (1970).

55.- C.A.R. Baxter and H.C. Richards.

J. Med. Chem., 14; 1033, (1971).

56.- R. Foster, B.L. Cheetham, and D.F. King,

Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 67; 685, (1973).

57.- V. de V. Clarke, D.M. Blair, M.C. Weber, and P.A. Garnett

S. Afr. Med. J., 50; 1867, (1976).

58.- R.P. Batzinger and E. Buending

J. Pharmacol. Exp. Ther., 200; 1, (1977).

59.- C.A.R. Baxter and H.C. Richards,

J. Med. Chem., 15; 351, (1972).

60.- A.W.J. Brome and N. Greenhalgh

Nature, 189; 59, (1961).

- 61.- P. Eyre, J. P
J. Pharm. Pharmacol., 22, 26 (1970).
-
- 62.- A.H.M. Raeymaekers, F.T.N. Alleweireld, J. Vandenberg; et. al.
J. Med. Chem., 9; 545, (1966).
- 63.- P.A.J. Janssen, Fortschr.
Arzneimittelforsch., 20; 347, (1976).
- 64.- H. Van Den Bossche and P.A.J. Janssen
Life Sci., 6; 1781, (1967)
-
- 65.- H. Van Den Bossche and P.A.J. Janssen
Biochem. Pharmacol., 18; 35, (1969).
- 66.- W.C. Austin, W. Courtney, J.C. Danilewicz, D.H. Morgan; AT.AL.
Nature, 212; 1273, (1966).
-
- 67.- J.W. Mc Farland, L. H. Conover, H.L. Howes; et. al.
J. Med. Chem., 12; 1066, (1969).
- 68.- J.W. Mc Farland and H.L. Howes, Jr.
J. Med. Chem., 15; 365, (1972)
- 69.- E. L. Lee, N. Iyngkaran, A.W. Grieve, M.J. Robinson; et. al.
Am. J. Trop. Med. Hyg., 25; 563, (1976).
- 70.- S.O.A. Bangose, V.O. Marquis, and L.A. Salako.
Brit. J. Pharmacol., 47; 117, (1973).
- 71.- F.C. Copp, O.D. Standen, J. J. Scarnell; et. al.
Nature, 181; 183, (1958).
- 72.- Conferense Report
Lisbon, June 1955,
Acta Trop., Suppl., 9, (1966).

- 73.- Conferense Report
New York, October 1967
Ann. N.Y. Acad. Sci.
160, Art. 2, 423 - 946, (1969)
- 74.- J.W. Faigle and H. Keberle,
Ann N.Y. Acad. Sci., Art.-2, 544 (1969).
- 75.- H.K. Urman, O. Bulay, D.B. Clayson, and P. Shubik
Cancer Lett., 1; 69, (1975).
- 76.- P.J. Islip, M.D. Closier, M.R. Johnson; et. al.
J. Med. Chem., 15; 101, (1972).
- 77.- P.J. Islip, M.D. Closier, and J.E. Weale.
J. Med. Chem., 16; 1027, (1973).
- 78.- L.M. Werbel and P.E. Thompson,
J. Med. Chem., 10; 32, (1967).
- 79.- D.K. Hass
Top. Med. Chem., 3; 171, (1970).
- 80.+ Durham, D.K. Hass, and J.J. Baudreau.
J. Med. Chem., 15; 1231, (1972).
- 81.- R.J. Hart and R.M. Lee.
Exp. Parasitol., 18; 332, (1966).
- 82.- G. Lämmler and E. Saupe
Z. Tropenmed. Parasitol., 20; 346, (1969)
- 83.- M.A. Gemmell and G. Uudemans
Res. Vet. Sci., 19; 217, (1975).

- 84.- G.D. Diana, A. Yarinsky, E.S. Zalay; et. al.
J. Med. Chem., 12; 791, (1969).
- 85.- E.F. Elslager, D.F. Worth, and J.D. Howells.
German Patent., 1; 876, Q86 (1969)
- 86.- L.M. Werbel, Isrdel
J. Chem., 14; 185, (1975).
- 87.- P.B. Hulbert, E. Bueding, and P.E. Hartman.
Science, 186; 647, (1974).
- 88.- D.W. Henry, V.H. Brown, M. Cory; et. al.
J. Med. Chem., 16; 1287, (1973)
- 89.- H.R. Stohler and A. Szente.
Third International
Congresso of Parasitology
Munich, 1974 (Abstract E 3 (11), p 1330).
- 90.- D. Düwell, W. Dürkheimer, and M. Schorr.
Z. Tropenmed. Parasitol., 21; 77 (1970).
- 91.- R.B. Burrows, C.J. Hatton, W.G. Lillis, and G.R. Hunt.
J. Med. Chem., 14; 87, (1971).
Ibid, 14; 87, (1971).
- 92.- P. Eyre.
Vet. Rec., 83; 605, (1968).
- 93.- M. Harfenist.
Pestic. Sci., 4; 871, (1973).
- 94.- D. Ap T. Rowlands,
Pestic. Sci., 4; 883, (1973).
- 95.- G.C. Colos
Res. Vet. Sci., 20, 110 (1976).

- 96.- H.P. Striebel
Experientia, 32; 457, (1976).
- 97.- E. Bueding, R. Batzinger, and G. Petterson.
Experientia, 32, 604 (1976)
- 98.- S.D. Folz, D.L. Rector, and S. Geng.
J. Parasitol., 62; 281, (1976).
- 99.- P.S. Jaglan, R.E. Gosline, and A.W. Neff.
J. Agr. Food. Chem., 24, 659, (1976).
- 100.- P. Andrews,
British Society for Parasitology Meeting,
Dundee, Scotland, April 1977.
- 101.- H.G. Sen, D. Seth, U.N. Joshi, and P. Rajagopalan.
J. Med. Chem., 9; 431-433, (1966)
- 102.- J.B. Carr, H.G. Durham, and D. Koltass.
J. Med. Chem., 20; 934-939, (1977).
- 103.- N.K. Kochetkov and S.D. Sokolov.
Recent Developments in Isoxazole Chemistry.
Ed. Academic Press, N.Y.
Advances Heterocyclic Chemistry., 2; 365-422, (1963).
- 104.- R.P. Barnes.
In "Heterocyclic Compounds"
(R.C. Elderfield, ed.), Vol 5; Chap 7, Wiley
New York, (1952).
- 105.- A.I. Meyers.
Heterocycles in Organic Synthesis.
Ed. Wiley Interscience.
New York (1974).

- 106.- L.A. Paquette.
Principles of Modern Heterocyclic Chemistry.
W.A. Benjamin, Inc.
New York (1968).
- 107.- S.S. Josin and I.R. Gambhir
J. Am. Chem., Soc., 78; 2222, (1956).
- 108.- A. Beellk and W.H. Brown.
Can. J. Chem., 32; 288, (1954).
- 109.- R. Fusco and S. Rossi.
Chemistry and Industry; December 21 de 1957; 1650.
- 110.- N.K. Kochetkov, A.N. Nesmeyanov, and N.A. Semenov.
Chem. Abstr; 47; 2167, (1953).
- 111.- N.K. Kochetkov
Izvest. Akad. Nauk. S.S.S.R.
Otdel, Khim. Nauk. p. 47 (1954).
- 112.- N.K. Kochetkov and E.D. Khomutova.
Zhur. Obshchei. Khim., 30; 954, (1960).
- 113.- W. Franke and R. Kraft
Angew Chem., 67; 395, (1955).
- 114.- C. Weygand and E. Bauer
Ann, 459; 123 (1927).
- 115.- A. Quilico and G. Speroni,
Gazz. Chim. Ital., 76; 148, (1946).
- 116.- P. Bravo, G. Gaudiano, A. Quilico and A. Ricca.
Gazz. Chim. Ital, 91, 47, (1961)

- 117.- P. Grünanger and E. Fabbri
Atti. Accad. Nazl. Lincei, Rend. Classe. Sci.
Fis. Mat. e Nat., 26; 235, (1959).
- 118.- V.N. Chistokletov, A.T. Troshchenko, and A.A. Petrov.
Do Klady Akad. Nauk. S.S.S.K., 135; 631, (1960).
- 119.- A.J. Boulton and A.R. Katritzky.
Tetrahedron, 12; 51, (1961).
- 120.- C. Caradonna and M.L. Stein.
Fármaco (Pavia) Ed. Sci, 15; 647, (1960).
- 121.- F.P. Doyle and J.H. C. Nayler
U.S. Patent 2, 996, 501 (10/4/1961).
- 122.- T.S. Gardner, E. Wenis and J. Lee.
J. Org. Chem., 26; 1514, (1961).
- 123.- L.O. Randall and R.E. Bagdon.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 80; 626, (1959).
- 124.- T. Winsor and P. Zarco.
Angiology, 11, 67, (1960);
Chem. Abstr., 54, 12359, (1960).
- 125.- A.L. Pons, M.F. Robba, R.H.P. Marey, and D. Duval.
Chem. Abstr., 77; 62012 d, (1972).
- 126.- V.J. Bauer, and S.R. Safir.
Chem. Abstr., 72; 79017 d, (1970).
- 127.- H. Graham A. and W. Hoyle.
Chem. Abstr., 70; 106501 z, (1969).
- 128.- Bondani G. Augusto.
La Seguridad de un nuevo medicamento:

- 129.- Cornelius, C.E.
N. Engl. J. Med., 281; 934, (1969)
- 130.- W.H.O. Scientific Group.
Principles for Pre-Clinical Testing in Drug Safety.
Wld. Hlth Org. Tech. Rep. Ser. N° 341, (1967).
- 131.- Europ. Soc. Stud. Drug. Tox.
The Study of the toxicity of a potential drug-basic principles.
Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, (1965).
- 132.- Zbinden G.
Science, 164; 643 (1969).
- 133.- Goldstein A, Aronow L., Kalman S.M.
Farmacología
Editorial Limusa
1a. Edición en Español.
México (1979).
- 134.- Miller, L.C. y Tainter, M.L.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. Med., 57; 261, (1944).
- 135.- Litchfield, J.L. Jr. y Wilcoxon F.
J. Pharmacol. Esper. Ther., 96; 99, (1949).
- 136.- G. Zbiden.
Clin. Pharmacol. Therap., 5; 537, (1964).

- 137.- Barnes, J.M. y Denz, F.A.
Pharmacol Rev., 6; 191, (1954).
- 138.- Zbinden, G.
Appl. Ther., 8; 128, (1966).
- 139.- Scholz, J.
Nature, 207; 870, (1965).
- 140.- WHO Scientific Group.
Principios Aplicables a la investigación experimental de la acción teratógena de los medicamentos.
Serie de informes técnicos N° 364, Ginebra, (1967).
- 141.- Ames, B.N.
Detection of chemical mutagens and carcinogens.
"Mutagenic Effects of Environment contaminants".
M.E. Sutton and M.I. Harris, Eds. Academic Press.
New York (1972), p. 57.
- 142.- Martín, E.W.
Hazards of Medication.
2nd. Edition
J.B. Lippincott Co.,
Philadelphia (1978).
- 143.- Litchfield, J.T. Jr.
Clin. Pharmacol. Ther., 3; 665, (1962).
- 144.- C.R. Hauser, F.W. Swamer, and J.T. Adams.
Organic Reactions., 8; 59-196, (1954).
- 145.- C.R. Hauser and B.E. Hudson Jr.
Organic Reactions., 1; 266-302, (1942).

- 146.- M.L. Miles, T.M. Harris, and C.R. Hauser.
Organic Syntheses, 46; 57-60, (1966)
- 147.- F.W. Swamer and C.R. Hauser.
J. Am. Chem. Soc., 68; 2647-2649, (1946).
- 148.- N. Green and F.B. La Forge.
J. Am. Chem. Soc., 70; 2287-2288, (1948).
- 149.- F.W. Swamer and C. R. Hauser.
J. Am. Chem. Soc., 72; 1352-1356, (1970).
- 150.- M.L. Miles, T.M. Harris, and C.R. Hauser.
J. Org. Chem., 30; 1007-1011, (1965).
- 151.- Anónimo.
Beilstein Handbuch, 4; Aufl VII.
Syst. N° 677 a 769 - 771.
Germany.
- 152.- A. Magnani and S.M. Mc Elevain
Organic Syntheses Collective, 3; 251-253 y 17 - 19, (1955)
- 153.- D.G. Hill, J. Burkus and C.R. Hauser.
J. Am. Chem. Soc., 81; 602-606, (1959).
- 154.- V.H. Wallingford, A.H. Homeyer and D.M. Jones.
J. Am. Chem. Soc., 63; 2056-2059, (1941).
- 155.- V.H. Wallingford, A.H. Homeyer and D.M. Jones.
J. Am. Chem. Soc., 63; 2252-2254, (1941).
- 156.- V.H. Wallingford, D.M. Jones, and A.H. Homeyer.
J. Am. Chem. Soc., 64; 576-578, (1942).
- 157.- A. Magnani and S.M. Mc Elvain.
J. Am. Chem. Soc., 60; 813-820, (1938)

- 158.- Waldo, L. Semon.
Org. Syn. Coll., 1; 318-321, (1941).
- 159.- Arthur Lachman.
Org. Syn. Coll., 2; 70-71, (1947).
- 160.- William P. Jencks.
J. Am. Chem. Soc., 81; 475-481, (1959).
- 161.- Rosenbergy, S.M. Silver, J.M. Sayer, and W.P. Jencks.
J. Am. Chem. Soc., 96; 7986-7998, (1974).
- 162.- M. Sayer, B. Pinsky, A. Schonbrunn, and W. Washtien.
J. Am. Chem. Soc., 96; 7998-8009, (1974).
- 163.- Straley, J.M. y Adams, A.C.
Checked by Max Tishter y Kazlowski, M.A.
Org. Syntheses Coll., 4; 415-417, (1963).
- 164.- Hudson, B.E. Jr. y Hauser, C.R.
J. Am. Chem. Soc., 63; 3156-3162, (1941).
- 165.- Riddick, J.A. y Bunger, W.B.
Techniques of chemistry. Vol II
Organic Solvents.
Thrid Edition
Wiley Interscience.
New York. (1970).
- 166.- Spiegel A.J. and Nese Woethy M.M.
J. Pharm. Sci., 52; 917-927, (1963).
- 167.- Cadwallader D.E.
J. Phar, Sci. 52; 1175-1180, (1963).
- 168.- Smith, B.L. and Cadwallader D.E.
J. Pharm. Sciences, 56; 351-355, (1967).

169.- Cadwallader, D.E. and Ku Shiao-Huan.
J. Pharm. Sciences, 63; 60-64, (1974).

170.- Read, Clark. P.
Parasitismo Animal
C.E.C.S.A.
1a. Edición en Español; Capítulo 3; 69-90.
México, (1978).

171.- Hubendick, B.
Kungl. Svenska. Vet-Akade-miens Handlinger Fjarde Serien
Band 3, N° 1, p. 223 (1951).
Stockhol, Almqvist Wiksells Boktryckeri Ab.

172.- Gómez Agudelo, T. Pérez R.A.R., y Zenón , B.F.
Rev. Lat. Amer. Microb.; 20; 121-127, (1978).

173.- Emile A, Malek.
Laboratory Guide and Notes for Medical Malacology
Burgess Publishing Company First. Edition. Minneapolis,
Minn. (1962).

174.- José Luis Casas y Lauro Trejo.
Centro Nacional de Parasitología Animal. (Comunicación per-
sonal)
México, (1980).

175.- José Luis Casas y Lauro Trejo.
Centro Nacional de Parasitología Animal (Comunicación per-
sonal)
México, (1980).

176.- Tomasa, R.G.
"Estudio de la absorción del 3,5-difenilisoxazol y su deter-
minación en fluidos biológicos por cromatografía de gases"
Facultad de Química U.N.A.M.
México, (1983).

202
177.- C.A.M. Hogben, D.J. Tocco, B.B. Brodies y L.S. Schanker.
J. Pharmacol. Exp. Therap., 125; 275, (1959).

178.- Chowhan Z.T. and Amaro A.A.
Journal of Pharmaceutical Sciences, 66; 1249-1253, (1977)

(Espectros)

VII.1.- Espectro de Infrarrojo de la Acetofenona.

VII.2.- Espectro de Infrarrojo del Dibenzoilmetano.

VII.3.- Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del Dibenzoil
metano.

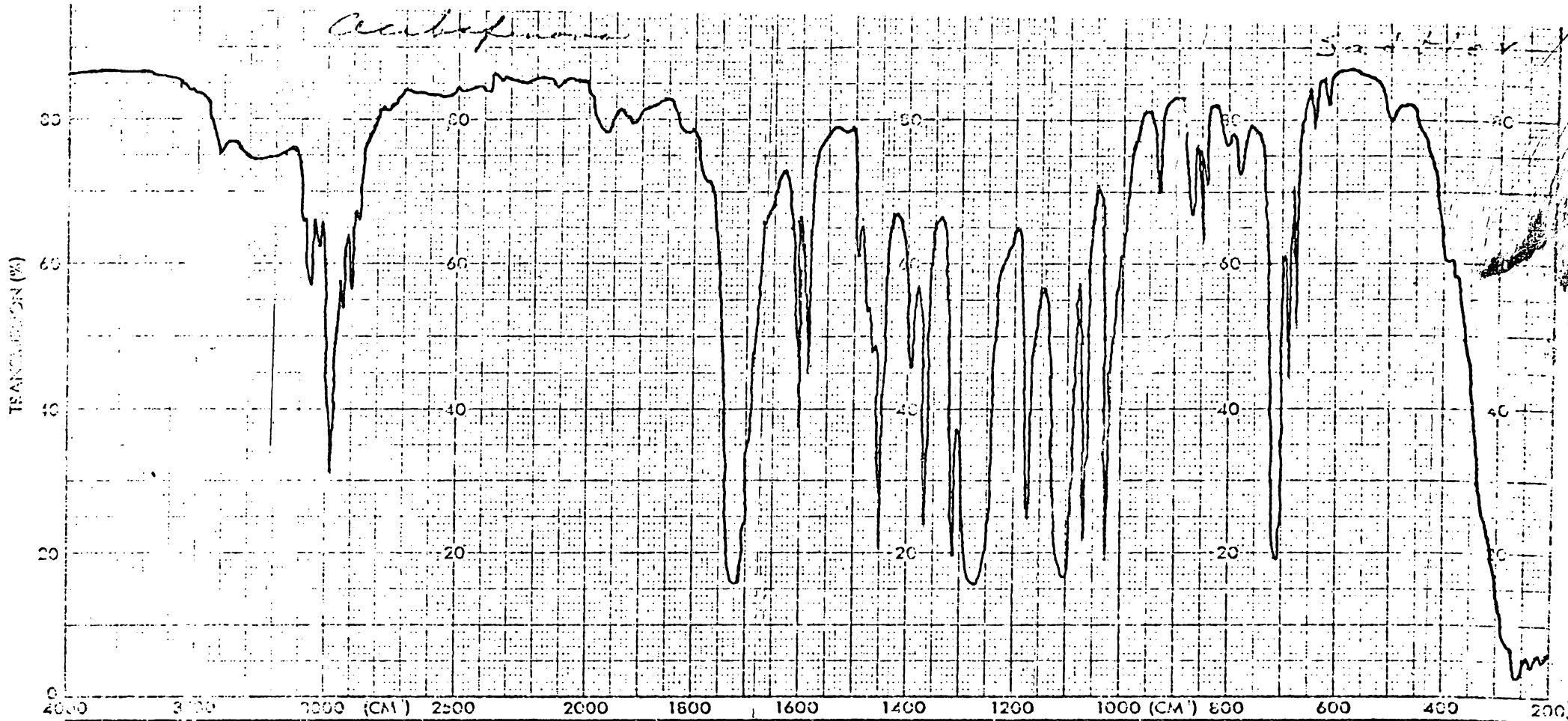
VII.4.- Espectro de Infrarrojo del 3,5-difenilicirazol.

VII.5.- Espectro de Resonancia Magnética Nuclear del 3,5-difeno-
nilisocirazol.

VII.6.- Espectro de Infrarrojo de la mezcla de reacción de pre-
paración de la 1-(3', 4', 5'- trimetoxifenil)-3-fenil-1,
3-propanodiona.

Todos los espectros de Infrarrojo fueron obtenidos en
un Espectrofotómetro Perkin - Elmer Modelo 599-B
y los espectros de Resonancia Magnética Nuclear en un Espec-
trofotómetro Varian de 90 MHz. Modelo EM-390.

Acetophenone

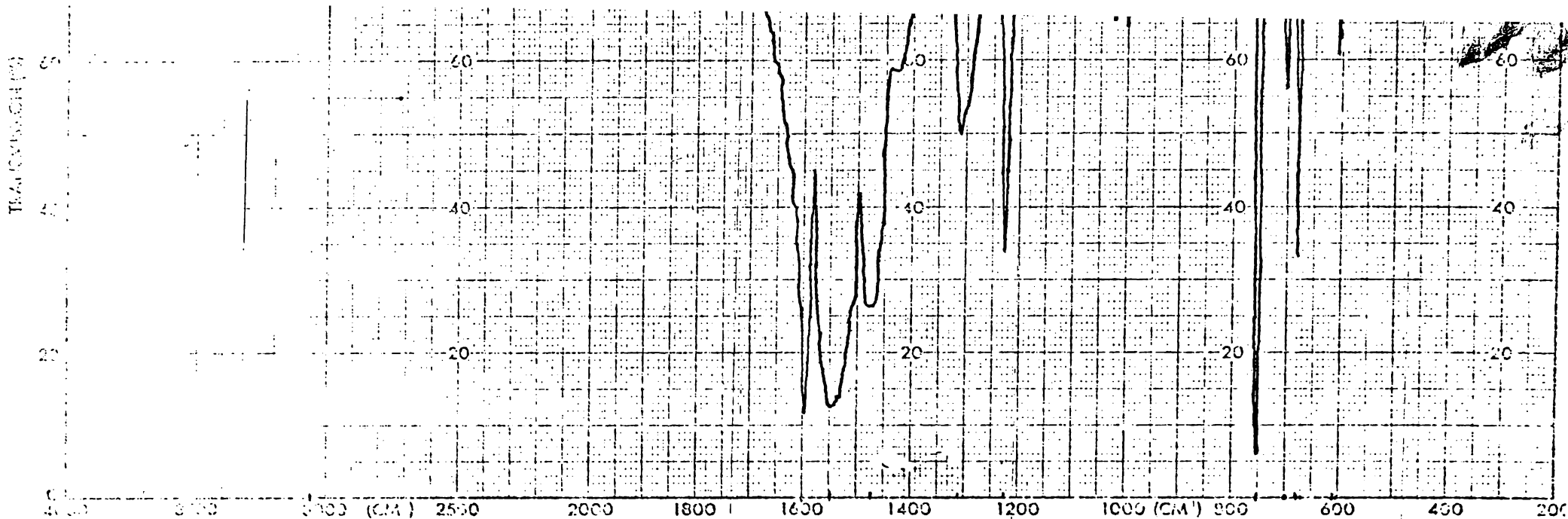


SAMPLE N-1-30

REF. NO.

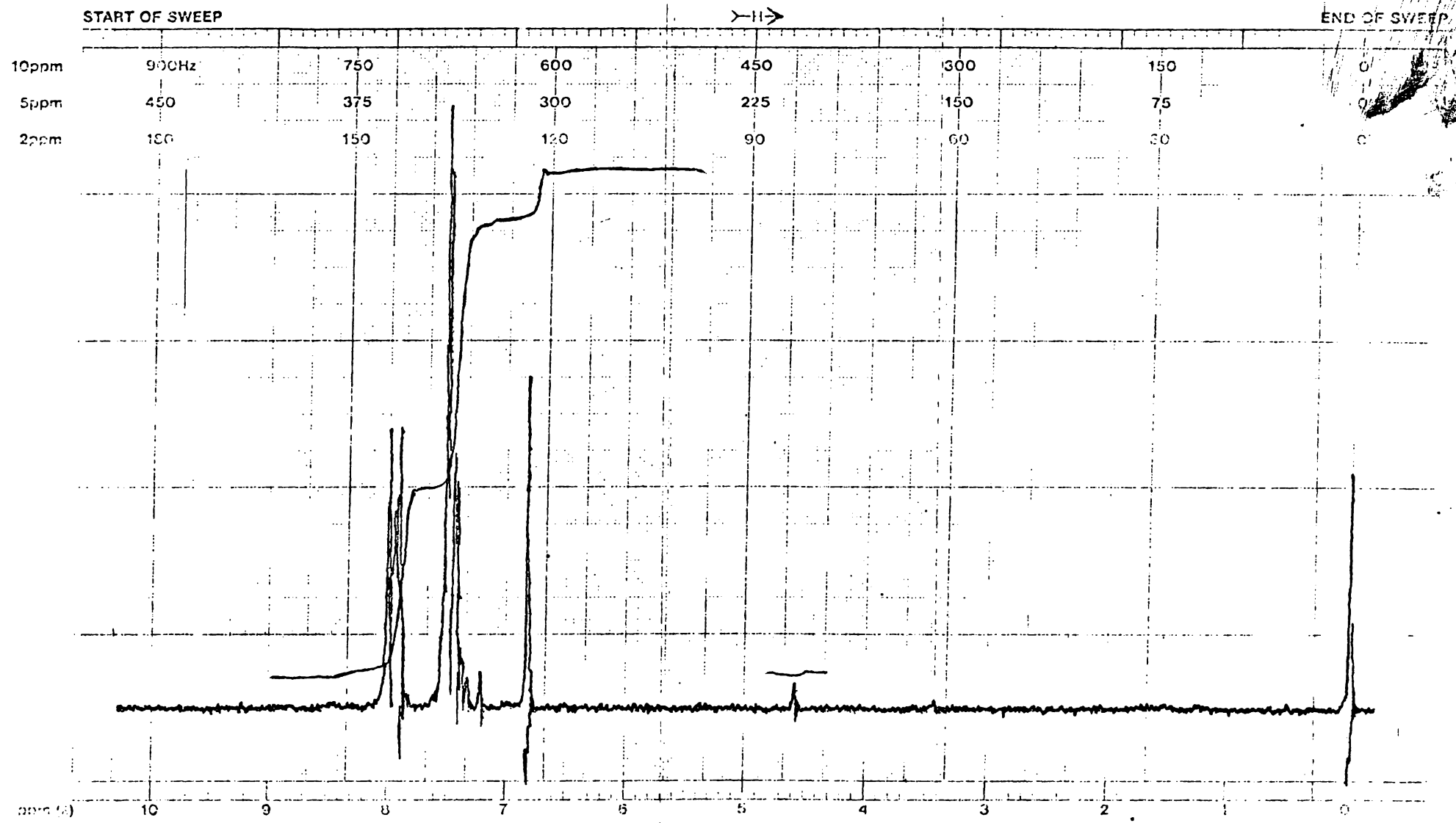
1422

ABSCISSA		ORDINATE		SCAN TIME <u>12</u>	REP. SCAN <u>SINGLE BEAM</u>
EXPANSION		EXPANSION		MULTIPLIER <u>1</u>	TIME DRIVE
<chem>c1ccccc1C(=O)OCC</chem>		% T <u>ABS</u>		SLIT PROGRAM <u>N'</u>	OPERATOR <u>Chel</u> DATE <u>5/10/51</u>
SAMPLE <u>N-1-30</u>		REMARKS <u>Pellets</u>		SOLVENT	CELL PATH
ORIGIN <u>Ignacis Chel</u>				CONCENTRATION	REFERENCE <u>Acet</u>

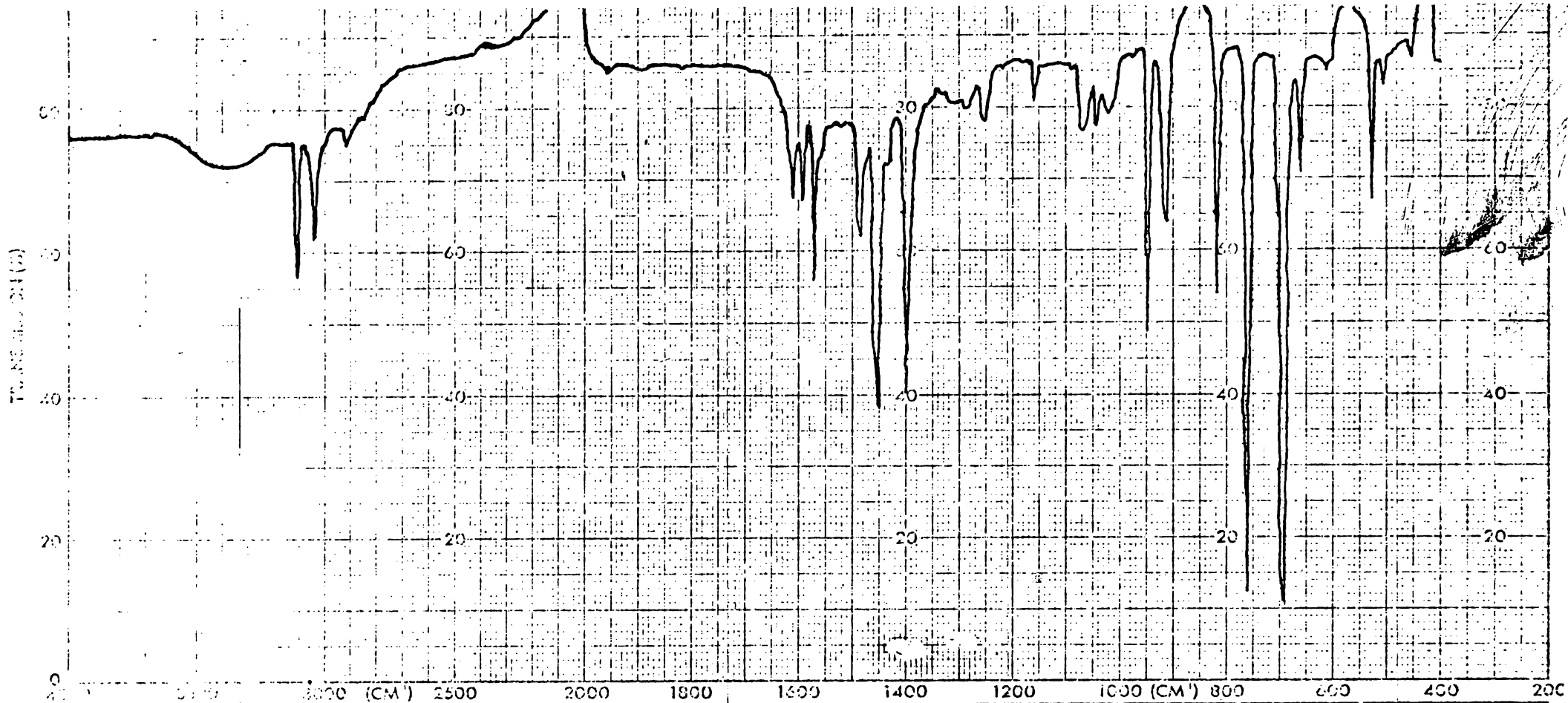


ABSC, S.A.	ORDINATE	SCAN TIME <u>12</u>	REP. SCAN <u>SINGLE BEAM</u>
EXPANSION	EXPANSION	MULTIPLIER <u>1</u>	TIME DRIVE <u>12</u>
<chem>C1=CC=C(C=C1)C2=CC=CC=C2</chem>	% T <input checked="" type="checkbox"/> ASS	SLIT PROGRAM <u>11</u>	OPERATOR <u>DeFaccio</u> DATE <u>22-04-81</u>
REMARKS <u>pastille</u>	SOLVENT <u>KSCN</u>	CELL PATH	REFERENCE <u>012</u>
	CONCENTRATION <u>-</u>		

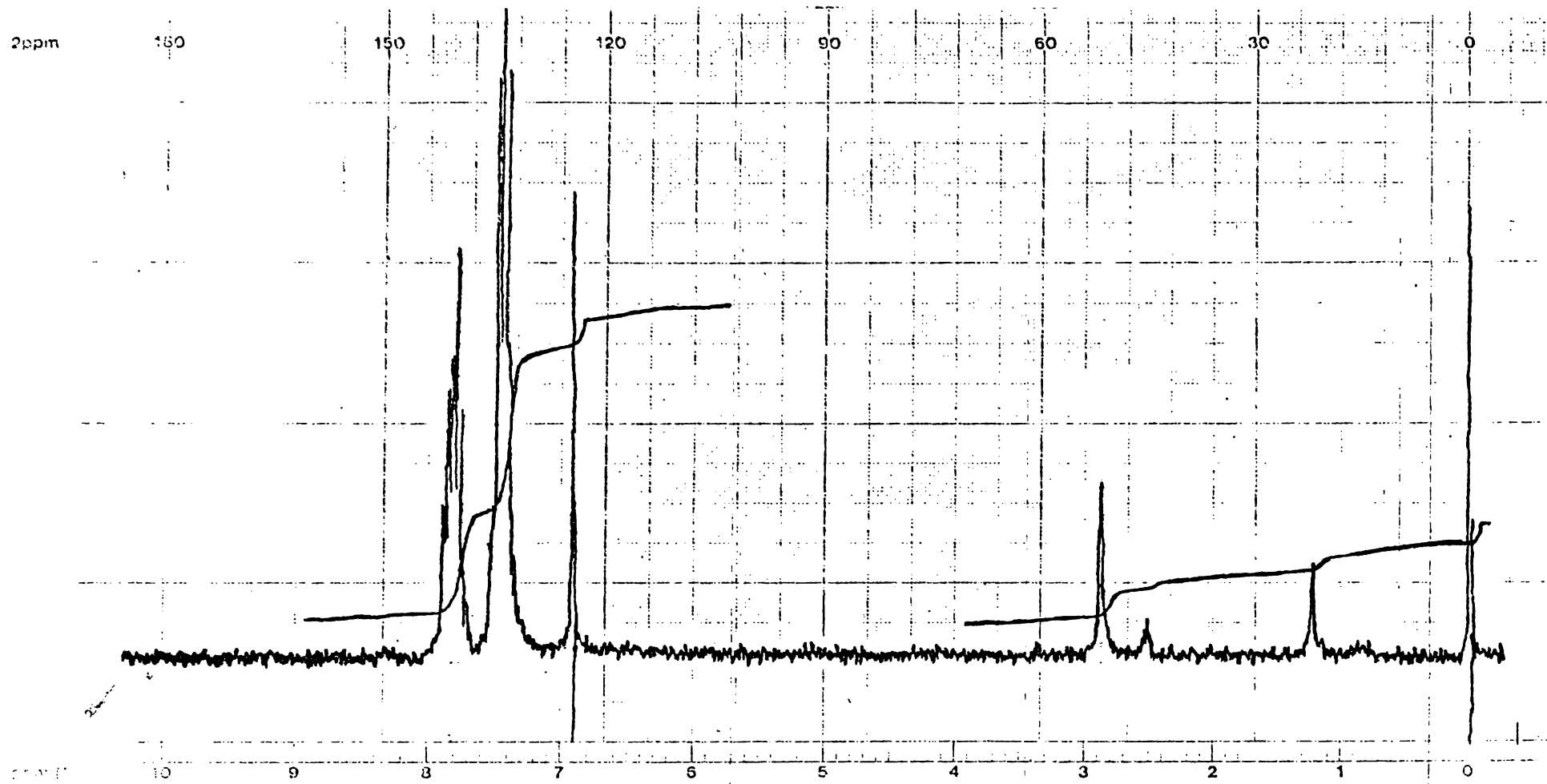
Varian Instrument Division



LOCK POS. _____ ppm	SPECTRUM AMPL. <u>2.5</u> X1000	SWEEP TIME <u>5</u> min	NUCLEUS <u>¹H</u>	SAMPLE: <u>Tacho 031</u>	OPER: <u>Aljardin</u>
LOCK POWER. _____ mG	FILTER <u>0.05</u> sec	SWEEP WIDTH <u>10</u> ppm	ZERO REF. <u>TMS</u>	<u>12-5-81</u>	DATE <u>12-5-81</u>
DECOUPLE POS. _____ ppm	RF POWER <u>0.05</u> mG	END OF SWEEP <u>0</u> ppm	SAMPLE TEMP. <u>A</u> °C	SOLVENT: <u>CDCl₃</u>	SPECTRUM NO. <u>4149</u>



INSTRUMENT	ORDINATE	SCAN TIME <u>10</u>	REP. SCAN <u>SINGLE BEAM</u>
EXPANSION	EXPANSION	MULTIPLIER <u>1</u>	TIME DRIVE <u>12</u>
	% T <u>ABS</u>	SLIT PROGRAM <u>✓</u>	OPERATOR <u>Marsala</u> DATE <u>8-06-81</u>
SAMPLE <u>10-1</u>	REMARKS <u>pastills</u>	SOLVENT <u>KBr</u>	CELL PATH <u>-</u>
DESCRIPTION <u>3.0 mg/ml Chloro</u>		CONCENTRATION <u>-</u>	REFERENCE <u>air</u>



ppm SPECTRUM AMPL 3.5 X 1000 SWEEP TIME 5 min NUCLEUS ¹H SAMPLE: Ignacio OPERATOR Aljandrea
 MHz FILTER 0.05 sec SWEEP WIDTH 10 ppm ZERO REF. 7.43 DATE 5-27-91
 DECOUPLING POWER _____ mg RF POWER 0.01 mg END OF SWEEP 0 ppm SAMPLE TEMP. 4 °C SOLVENT: CDCl₃ + DMSO SPECTRUM NO. 4205

