



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTUDIO DE LA ABSORCION DEL 3,5-DIFENIL
ISOXAZOL Y SU DETERMINACION EN FLUIDOS
BIOLOGICOS POR CROMATOGRAFIA DE GASES.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P R E S E N T A

TOMASA ROMERO GARCIA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

I.	INTRODUCCION Y OBJETIVO	1
II.	GENERALIDADES	4
III.	PARTE EXPERIMENTAL	8
IV.	RESULTADOS	32
V.	ANALISIS DE RESULTADOS	44
VI.	CONCLUSIONES	53
VII.	BIBLIOGRAFIA	55

CAPITULO I

INTRODUCCION

Debido a la elevada frecuencia con que se presentan en nuestro país las enfermedades infecciosas producidas por helmintos, aproximadamente el 88% de la población presenta este tipo de parasitosis habiendo regiones donde la helmintiasis constituye el principal problema de salud pública (4, 16). Algunos de los medicamentos empleados hasta el momento presentan diversos efectos tóxicos, debido a que los tratamientos para estos padecimientos son prolongados y/o las dosis requeridas son altas para tener eficacia, es necesario desarrollar fármacos que eleven su eficiencia y que disminuyan su toxicidad (4).

La introducción de un nuevo fármaco al arsenal terapéutico requiere de una profunda evaluación de su eficacia y seguridad, por lo cual se somete a numerosos estudios en animales para conocer sus riesgos y características farmacológicas con el fin de ser administrados al hombre.

Se considera que la naturaleza y la intensidad de la respuesta biológica obtenida con un compuesto químico específico en animales y en humanos, se debe no sólo a actividad inherente a la estructura molecular, sino también a las características de absorción y distribución, como procesos fundamentales para que una sustancia pueda lle-

gar al sitio de acción (24, 25), por consiguiente es importante conocer la absorción de las sustancias que son sometidas a los estudios preclínicos para evaluar adecuadamente su perfil de actividad farmacológica. Si dicha sustancia se administra inadecuadamente y se absorbe pobrememente, probablemente no se alcanzarían las concentraciones requeridas para producir su acción, y por lo tanto los resultados de la evaluación farmacológica y la determinación de los efectos tóxicos serían erróneos. Para que una sustancia se administre adecuadamente en la fase preclínica debe tomarse en cuenta: su solubilidad, disolución intrínseca, coeficiente de partición, tamaño de partícula, su coeficiente de permeabilidad, la vía y sitio de administración. Resumiendo lo anterior, todos estos factores, según Wagner (25) se clasifican como factores de introducción que el experimentador puede modificar y son determinantes para su acción farmacológica.

El 3,5-difenil isoxazol es una sustancia nueva con posible actividad antihelmíntica, se sintetizó en el Departamento de Química Farmacéutica y Productos Naturales de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, U.N.A.M. (20). Para que esta sustancia pueda ejercer su acción es necesario que se absorba y alcance las concentraciones requeridas en el hígado donde se encuentra el agente infectante.

Este trabajo de tesis tuvo como objetivo específico

el desarrollo de un método analítico por cromatografía de gas líquido para cuantificar el 3,5-difenil isoxazol en fluidos biológicos, para determinar su coeficiente de permeabilidad y su grado de excreción. El coeficiente de permeabilidad es una característica de la absorción de una sustancia la cual en este caso se determinó siguiendo el método del intestino invertido de rata (2, 9, 10); y el grado de excreción del 3,5-difenil isoxazol (DIZ) se determinó después de su administración intraperitoneal en suspensión acuosa y en solución oleosa a ratones, de estos estudios se podrá concluir si el 3,5-difenil isoxazol presente problemas de permeabilidad y consecuentemente de absorción.

CAPITULO II

GENERALIDADES

Existen reportes de Carr y Durhan acerca de la actividad antihelmíntica de los derivados del isoxazol, como el 3,5-difenil isoxazol, 3-fenil isoxazol y el 3-aril-halometil isoxazol, que demostraron su actividad cuando fueron administrados en suspensión acuosa por vía oral a ratones infectados con *N. braziliensies* y con *H. nana* (2, 4, 14), en dichos estudios observaron que los compuestos con un fenilo en la posición 3 ó 5 presentaban actividad antihelmíntica. En base a estas observaciones se sintetizó el 3,5-difenil isoxazol con posible actividad antihelmíntica, la síntesis se llevó a cabo en el Departamento de Química Farmacéutica y Productos Naturales de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, U.N.A.M. (20). Los estudios de la evaluación de la actividad antihelmíntica y la identificación de los efectos tóxicos de dicha substancia, se realizaron en el Instituto Nacional de Parasitología Animal. En estos estudios de actividad farmacológica se emplearon ratones machos de 12 a 14 semanas de edad, con un peso promedio de 30 gramos, la substancia fué administrada en suspensión acuosa y en solución oleosa, ambas por vía intraperitoneal, se emplearon dosis diferentes de 7.8; 15.6, 31.2, 62.5 mg/Kg. Estas dosis fueron seleccionadas en base a

los derivados de Carr, Durhan (5, 19), que presentaban actividad antihelmíntica en el intervalo de dosis de 16 a 500 mg/Kg cuando fueron administrados por vía oral a ratones infectados.

Para evaluar los efectos tóxicos del 3,5-difenil isoxazol, se administraron las dosis siguientes: 7.8, 15.6, 31.2, 62.5 mg/Kg en suspensión acuosa y en solución oleosa, ambas por vía intraperitoneal a lotes de 6 ratones sanos, los cuales permanecieron en observación durante 7 días y ninguno murió, se sacrificaron y se les realizó la necropsia, no observándose macroscópicamente ninguna lesión en los órganos principales (hígado, riñón, pulmones, etc.), esto indica que la sustancia pudiera ser particularmente atóxica en forma aguda. No se realizaron cortes histológicos, ni se determinó la dosis letal 50 por que el propósito solamente fué evaluar que las dosis administradas no causaran la muerte.

Para evaluar la actividad antihelmíntica del DIZ, se administraron las dosis siguientes: 7.8, 15.6, 31.2, 62.5 mg/Kg en suspensión acuosa y en solución oleosa ambas por vía intraperitoneal a un lote de 6 ratones infectados con fasciola hepática. El día cero se inoculó cada ratón, por vía oral con 12 metacercarias y permanecieron en observación. El tratamiento con el 3,5-difenil isoxazol se administró el 15^a día después del día de inoculación, ya que las metacercarias necesitan 14 días para llegar al

hígado y empezar a provocar lesiones agudas. Continuaron en observación y en el catorceavo día después de la administración del DIZ, todos los ratones habían muerto; realizándose la necropsia para conocer la causa, se encontró que todos murieron por fasciolosis ya que en todos los casos se observó el hígado completamente desecho por la actividad necrosante de las fasciolas, además de una gran cantidad de abscesos y hemorragia interna. Esto demostró que el DIZ no tiene efecto antihelmíntico al ser administrado por vía intraperitoneal y convendría realizar estos estudios usando otra vía de administración.

Durante la fase preclínica del desarrollo de un nuevo fármaco, es necesario conocer los factores que rigen la absorción, ya que se ha demostrado que la característica de absorción de una sustancia está íntimamente relacionada con su acción farmacológica (3, 24, 25). La absorción nos puede dar una pauta para designar cuidadosamente la dosis y la vía de administración más adecuada para el estudio preclínico, porque en muchas ocasiones no se tiene la respuesta biológica esperada y no es porque la molécula carezca de la actividad inherente, sino debido a que la sustancia no tiene características fisicoquímicas y biofarmacéuticas necesarias para atravesar la membrana y llegar al torrente sanguíneo para ejercer su acción.

La absorción y el coeficiente de permeabilidad son

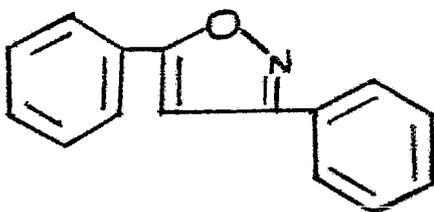
parámetros característicos de cada fármaco, por tal razón deben determinarse en la etapa preclínica para reducir el tiempo y costo del desarrollo de un nuevo fármaco (13).

Para el estudio de las propiedades ya mencionadas es necesario desarrollar un método analítico que nos permita determinar el fármaco y/o sus metabolitos principales en fluidos biológicos. El método seleccionado debe ser sensible, reproducible, específico y lineal en el intervalo de concentraciones de interés biológico (2, 6).

Aspectos Físicos.

Nombre Químico: 3,5-difenil isoxazol.

Fórmula Estructural



Fórmula condensada: $C_{15}H_{11}ON$

Peso Molecular: 221

Punto de Fusión: 134 - 135°C

Descripción: Cristales amarillos en forma de agujas

Solubilidad: Insoluble en agua y soluble en disolventos orgánicos

Espectro de Infrarrojo. (ver pág. 55).

CAPITULO III

PARTE EXPERIMENTAL

En este capítulo se describe el procedimiento seguido para estudiar el grado de excreción y el coeficiente de permeabilidad del 3,5-difenil isoxazol, a través de su cuantificación en orina, por el método de cromatografía de gas líquido.

3.1. Determinación del 3,5-difenil isoxazol en orina y en solución Krebs Ringer.

3.1.1. Reactivos

El 3,5-difenil isoxazol (DIZ) sintetizado en el Departamento de Química Farmacéutica y Productos Naturales de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, U.N.A.M., cloroformo, grado reactivo (J.T. Baker); Octadecanol, grado reactivo (J.T. Baker); Tetradecanol, grado reactivo (J.T. Baker); Etanol, grado reactivo (J.T. Baker); Fosfato de sodio dibásico, grado reactivo (J.T. Baker); Dicloroetano, grado reactivo (J.T. Baker); Acetato de etilo, grado reactivo (Merck); Benceno, grado reactivo (J.T. Baker); Tolueno, grado reactivo (J.T. Baker); Cloruro de sodio, grado reactivo (J.T. Baker); Cloruro de potasio, grado reactivo (J.T. Baker); Cloruro de calcio, grado reactivo (J.T. Baker); Fosfato de potasio monobásico, grado reactivo (J.T. Baker); Sulfato de magnesio pentahidratado, grado reactivo (J.T. Baker); glucosa,

grado reactivo (Provain de México, S.S.); Twin 80, aceite de maíz; Diazepam, grado farmacéutico; Fenil butazona, grado farmacéutico. Para elaborar las curvas patrón se empleó orina fresca, libre de fármacos, de un paciente clínicamente sano.

3.1.2. Equipo.

Cromatógrafo de gases, Varian, Modelo 3700, con detector de ionización de flama, columna de vidrio de 122 X 0.32 centímetros, empacada con SE- 30 al 1% en cromosorb W.H.P. 80/100; centrifuga clínica, Modelo Dymar; Vortex, Thermoline, Modelo 16715.

3.1.3. Método.

El patrón interno seleccionado como el más adecuado en el cromatografía de gas líquido fué el octadecanol, el proceso de operación del cromatógrafo fué isotérmico para mayor precisión, las condiciones de operación seleccionadas fueron las siguientes:

Temperatura de la columna	165°C
Temperatura del inyector	210°C
Temperatura del detector	210°C
Flujo de nitrógeno	30 ml/min

La relación de gases de detección se calibró a su máxima sensibilidad.

Para la extracción del 3,5-difenil isoxazol de fluidos biológicos se probó la solubilidad en cloroformo, dicloroetano, to-ueno, benceno, acetato de etilo, de los cua

les se seleccionó el cloroformo como el disolvente más adecuado para la extracción del 3,5-difenil isoxazol.

Para llevar a cabo la extracción del 3,5-difenil isoxazol de la orina y de las heces, se prepararon una solución amortiguadora de fosfato dibásico 0.5 molar y una solución clorofórmica con el patrón interno en una concentración de 25 µg/ml de octadecanol.

En un matraz de 10 ml se colocó la cantidad de 10 mg del 3,5-difenil isoxazol, se disolvió y se aforó con etanol. A partir de esta solución que contiene 1.0 mg/ml del DIZ se hicieron diluciones adecuadas con orina para obtener las concentraciones siguientes: 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 µg/ml con objeto de hacer una curva patrón. En un tubo de ensaye de 10 ml (silanizado) se colocó 1 ml de orina conteniendo el DIZ, 1 ml de solución amortiguadora de fosfato dibásico 0.5 molar y 1 ml de cloroformo. El contenido del tubo se mezcló vigorosamente en un vortex durante un minuto, se centrifugó a 1000 r.p.m. durante 10 minutos, se separó la fase clorofórmica a otro tubo de ensaye de 10 ml (silanizado), el proceso de extracción se repitió con 1 ml de cloroformo. Los extractos clorofórmicos se unieron mezclándose vigorosamente, se transfirió 1 ml de esta solución a un frasco vial con base cónica al cual se le adicionó 1 ml de la solución clorofórmica que contiene el patrón interno (25 µg/ml), el cloroformo se evaporó a temperatura ambiente

bajo una corriente de nitrógeno y el residuo se reconstituyó con 40 µl de cloroformo. De esta solución se inyectaron 1.8 a 2.0 µl al cromatógrafo con las condiciones cromatográficas indicadas en el inciso 3.1.3., el método descrito aquí se ilustra en la Figura No. 1.

3.1.4. Linealidad.

Para determinar la linealidad del método se analizaron curvas patrón del DIZ en orina, en un intervalo de concentraciones de: 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 13.5, 15.0 µg/ml siguiendo el método descrito anteriormente.

3.1.5. Porcentaje de recuperación.

Para determinar el porcentaje de recuperación del 3,5-difenil isoxazol a partir del método descrito se elaboraron 6 curvas patrón 3 en solución clorofórmica conteniendo el patrón interno (25 µg/ml de octadecanol) y las otras tres en solución de orina humana. Se siguió el método descrito en el inciso 3.1.3. Todas las curvas se hicieron en un intervalo de concentraciones de: 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 µg/ml del 3,5-difenil isoxazol.

3.1.6. Reproducibilidad.

La reproducibilidad del método se evaluó analizando otras 6 curvas patrón del 3,5-difenil isoxazol en orina humana en un intervalo de concentraciones de: 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 µg/ml durante 6 días diferentes siguiendo el método descrito del diagrama de la figura No. 1.

3.1.7. Linealidad y Reproducibilidad del método ana-

lítico para cuantificar el 3,5-difenil isoxazol en solución Krebs Ringer.

La linealidad y la reproducibilidad se evaluó analizando 4 curvas patrón del 3,5-difenil isoxazol en solución Krebs Ringer (12). A partir de la solución madre que contiene 1.0 mg/ml del 3,5-difenil isoxazol en etanol se hicieron diluciones adecuadas con solución de Krebs Ringer para obtener las concentraciones siguientes: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 µg/ml del 3,5-difenil isoxazol, el método de análisis fué el mismo que se observa en el diagrama de la Figura No. 1.

3.2. Determinación de Diazepam en solución Krebs Ringer.

El Diazepam se utilizó como referencia para comparar el coeficiente de permeabilidad del 3,5-difenil isoxazol, dicho fármaco se empleo por que se absorbe bien tanto In Vitro como In Vivo.

3.2.1. Reactivos.

Los mismos al inciso 3.1.1.

3.2.2. Equipo.

Los mismos al inciso 3.1.2, la columna empacada con G.P. al 2% en cromosorb W.H.P. 80/100.

3.2.3. Método.

El patrón interno para la determinación de Diazepam por cromatografía de gas líquido fué la Fenilbutazona y las condiciones cromatográficas seleccionadas fueron las

siguientes:

Temperatura de la columna	230°C
Temperatura del inyector	300°C
Temperatura del detector	300°C
Flujo de nitrógeno	36 ml/min

La relación de gases de detección se calibró a su máxima sensibilidad.

El procedimiento para cuantificar el Diazepam en so-lución Krebs Ringer fué el mismo que el que se observa en el diagrama de la Figura No. 1

3.2.4. Linealidad y Reproducibilidad del Método.

Para evaluar la linealidad y la reproducibilidad del método usado para cuantificar el Diazepam en cromatografía gas líquido, se analizaron 3 curvas patrón de Diazepam en solución Krebs Ringer en un intervalo de concentra-ciones de 5 a 25 $\mu\text{g/ml}$.

Se separó una solución clorofórmica del patrón interno de fenilbutazona en una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$.

En un matraz de 10 ml se colocó la cantidad de 10 mg de Diazepam, se disolvió y se aforó con etanol; de esta solución se hicieron diluciones apropiadas con solución krebs Ringer para obtener las concentraciones siguientes: 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 $\mu\text{g/ml}$ de Diazepam. Para la cuantificación de Diazepam en estas soluciones patrón de Krebs Ringer se aplicó el procedimiento indicado en la Figura No. 1.

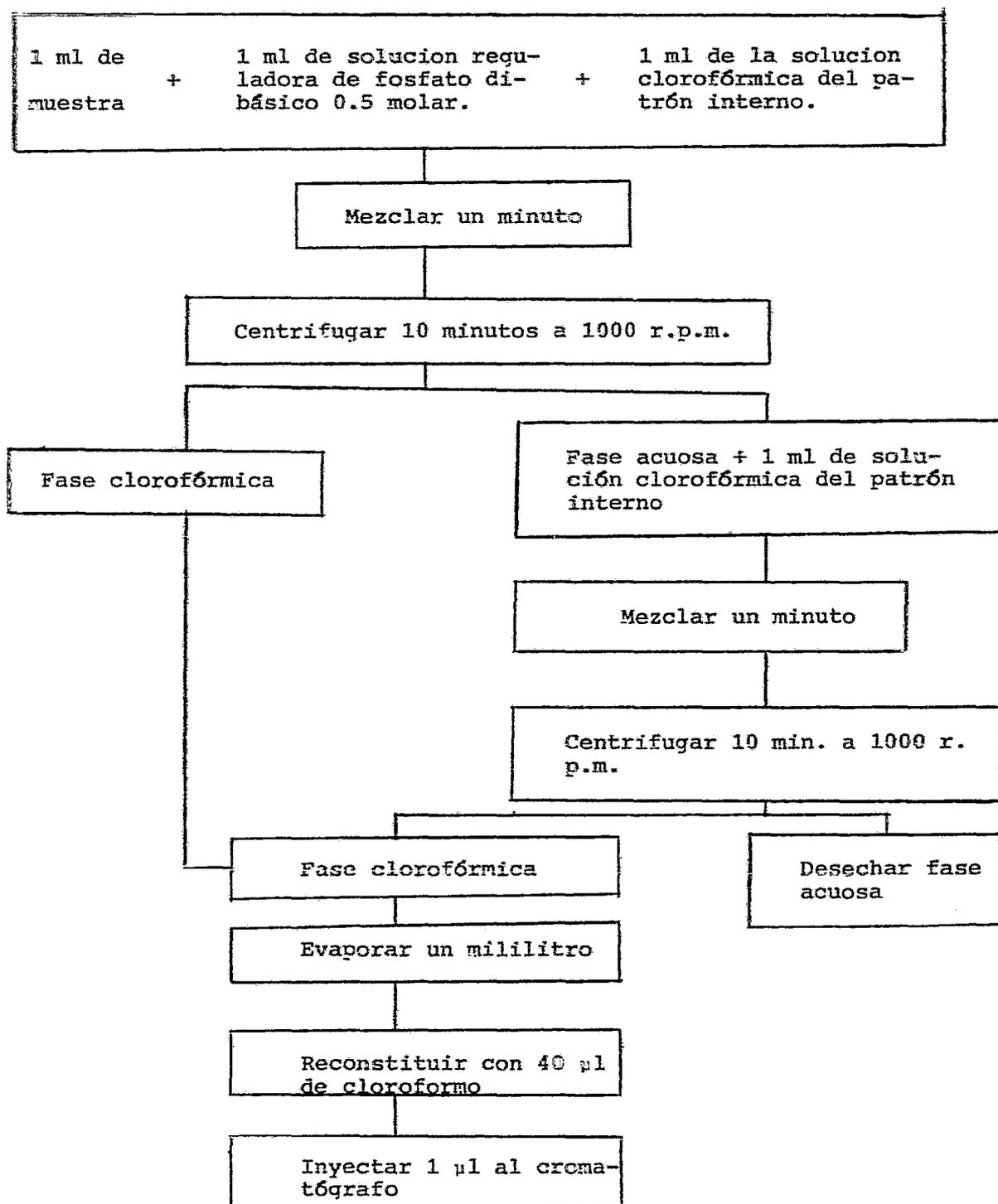


Figura No. 1. Procedimiento general para cuantificar el 3,5-Dimetil isoxazol en orina, heces y en solución serosal.

3.3. Absorción In Vivo.

El estudio de la absorción In Vivo del 3,5-Difenil isoxazol se realizó en ratones, a los cuales se les administró por vía intraperitoneal una suspensión acuosa y una solución oleosa ambas conteniendo la misma dosis en un mililitro de vehículo.

3.3.1. Material y Reactivos.

Además del material mencionado en el inciso 3.1.1., se emplearon ratones machos limpios de cepa Tacni de 12 a 14 semanas de edad con un peso promedio de 30 gramos.

3.3.2. Método.

Para este estudio se usaron dos formulaciones, una suspensión acuosa y una solución oleosa, el contenido de cada una de las formulaciones se presenta en la Tabla I.

Para este estudio se emplearon 24 ratones, los cuales se pesaron y se dividieron en dos grupos. En el primer grupo de 12 ratones a los 4 primeros se les administró una suspensión acuosa por vía intraperitoneal en dosis diferentes: 7.8, 15.6, 31.2, 62.5 mg/Kg del DIZ, a los siguientes 6 ratones una dosis de 31.2 mg/Kg de la misma substancia en suspensión acuosa, dejando 2 como testigo sin administrar el producto (8 y 12). Al segundo grupo de 12 ratones se les administraron las mismas dosis por la misma vía intraperitoneal pero en solución oleosa, dejando también 2 ratones testigo (No. 20 y 24), posteriormente a la administración, se colocaron individualmente en jaulas metabólicas para coleccionar la orina

y las heces. Los tiempos de colección de muestras de orina y de heces se presentan en la Tabla II.

De los primeros 8 ratones de ambos grupos se colectó la orina y de los siguientes 4 ratones de ambos grupos se colectaron las heces. Tanto las muestras de orina como las muestras de heces se analizaron siguiendo el método descrito en el diagrama de la figura No. 1.

TABLA I. Contenido de las Formulaciones administradas en suspensión acuosa y en solución oleosa.

Suspensión Acuosa	3,5-Difenil isoxazol	312 mg
	Twin 80	0.1 ml
	Aqua destilada c.b.p.	10.0 ml
Solución Oleosa	3,5-Difenil isoxazol	312 mg
	Aceite de maíz c.b.p.	10.0 ml

TABLA II. Tiempos de muestreo para la colección de orina y de las heces después de la administración intraperitoneal del 3,5-Difenil isoxazol en suspensión acuosa y en solución oleosa, a tonos.

Formulación	No. Ratón	Dosis (mg/Kg)	Tiempo (horas)	Muestra
	1	7.8	0 - 72	Orina
	2	15.6	0 - 72	"
	3	31.2	0 - 72	"
	4	62.5	0 - 72	"
Suspensión	5	31.2	0 - 48	"
Acuosa	6	"	0 - 48	"
	7	"	0 - 48	"
	8	-	0 - 48	"
	9	31.2	0 - 72	Heces
	10	"	0 - 72	"
	11	"	0 - 72	"
	12	-	0 - 72	"

TABLA II. Continuación

Tiempos de muestreo para la colección de orina y de las heces después de la administración intraperitoneal del 3,5-Difenil isoxazol en suspensión acuosa y en solución oleosa, a ratones.

Formulación	No. Ratón	Dosis (mg/Kg)	Tiempo (horas)	Muestra
	13	7.8	0 - 72	Orina
	14	15.6	0 - 72	"
	15	31.2	0 - 72	"
	16	62.5	0 - 72	"
Solución	17	31.2	0 - 48	"
Oleosa	18	31.2	0 - 48	"
	19	"	0 - 48	"
	20	-	0 - 48	"
	21	31.2	0 - 72	Heces
	22	"	0 - 72	"
	23	"	0 - 72	"
	24	"	0 - 72	"

3.4. Absorción In Vitro.

Para estudiar la absorción In Vitro de 3,5-Difenil isoxazol se empleó el método del intestino invertido de rata (9); el Diazepam se utilizó como referencia para evaluar y comparar el coeficiente de permeabilidad de 3,5-Difenil isoxazol.

3.4.1. Material y Reactivos.

El material y los reactivos ya mencionados en el inciso 3.1.1., además de ratas machos de cepa Winstar de un peso promedio de 220 gramos.

3.4.2. Equipo.

El aparato del método del intestino invertido de rata descrito originalmente por Crane y Wilson (10) como el que se observa en la figura No. 2 y el equipo ya mencionado en el inciso 3.1.2.

3.4.3. Método.

Como lo indica la técnica descrita por Chowhan y Amaro se dejó sin alimento a una rata macho de un peso promedio de 220 gramos durante 18 horas permitiéndole el libre acceso al agua. La rata se sacrificó con éter, se le extrajo el intestino delgado colocándolo en una caja de petri con solución Krebs Ringer, se lavó con 40 mililitros de la misma solución, se ligó uno de los extremos con un pedazo de catgut # 000 y con una varilla de vidrio de punta roma se invirtió el intestino, se cortaron segmentos de 10 centímetros de la porción del yeyuno del in

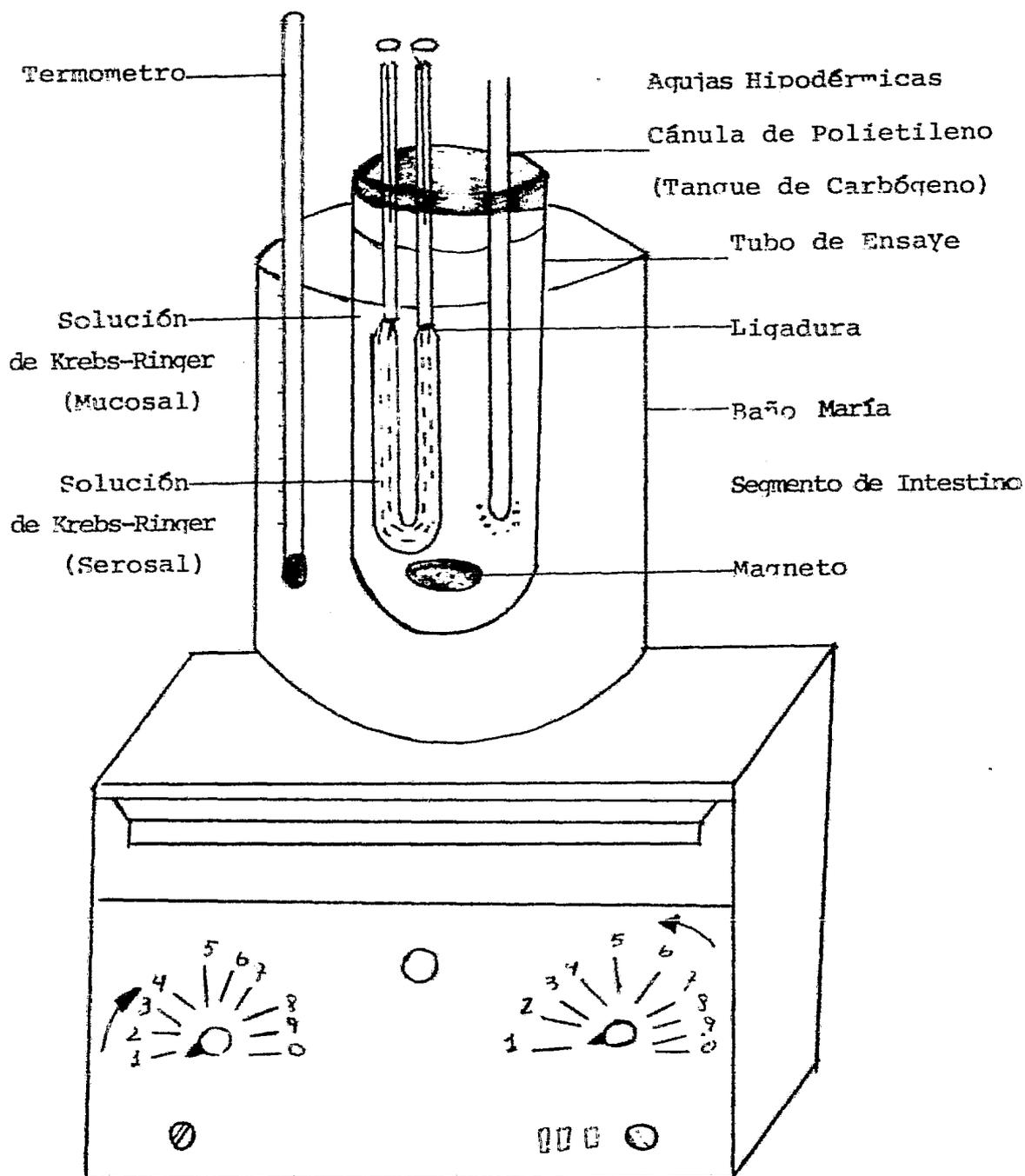
testino de rata y a cada segmento se le introdujo una cá-
nula de polietileno perforado, se ligaron ambos extremos
como se muestra en la figura No. 2.

En un tubo de ensaye de 50 mililitros se colocaron
40 mililitros de la solución Krebs Ringer y se adiciona-
ron 200 μ l de la solución que contenía 1 mg/ml del 3,5-
Difenil isoxazol para obtener una concentración de 5 μ g/ml,
se mantuvo la temperatura constante a 37°C, 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 mili-
litros por minuto, bajo la agitación constante, posterior-
mente se sumergió el intestino invertido en el tubo de
ensaye, se colocaron 2 mililitros de la solución Krebs
Ringer en el saco del intestino invertido, transcurridos
20 minutos se extrajo la solución serosal, se lavó con un
mililitro de solución y se añadieron otros 2 mililitros
de la solución Krebs Ringer. Este procedimiento se re-
pitió durante 5 veces a intervalos de 20 minutos (en 100
minutos). Las muestras se analizaron siguiendo el método
descrito en la sección 3.1.3.

El procedimiento seguido experimentalmente para es-
tudiar la absorción In Vitro del diazepam fué el mismo
del intestino invertido de rata como se mencionó anterior-
mente. En otro tubo de ensaye de 50 mililitros se coloca-
ron 40 mililitros de la solución Krebs Ringer y se adicio-
naron 4 miligramos de Diazepam para obtener una concentra-

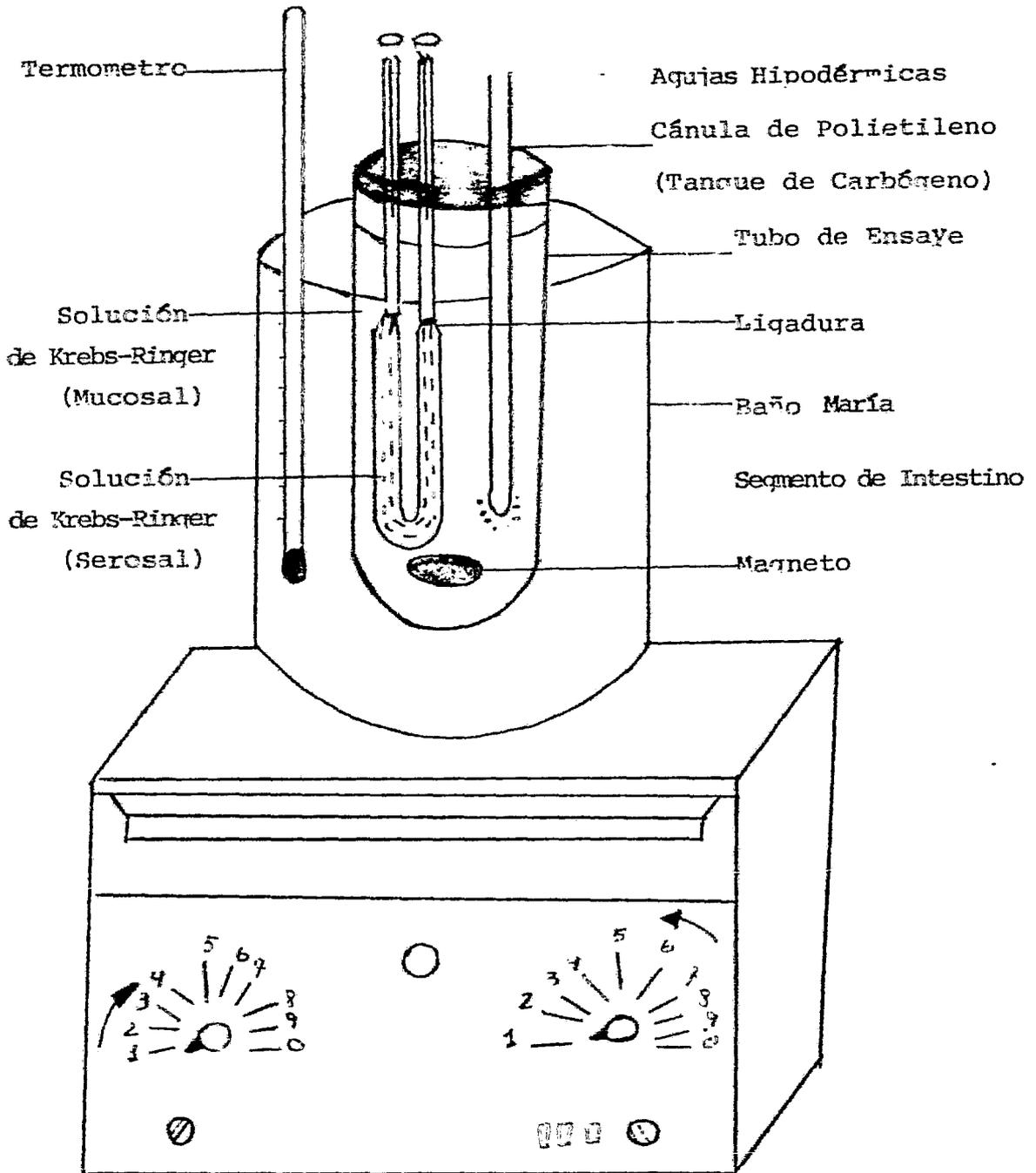
ción de 100 µg/ml, se trabajó en las mismas condiciones ya mencionadas, se sumergió la porción del intestino invertido en el tubo de ensaye y se colocaron 2 mililitros de la solución Krebs Ringer en el saco del intestino invertido. Transcurridos 20 minutos se extrajo la solución serosal, se lavó con un mililitro de solución y se añadieron otros 2 mililitros de solución Krebs Ringer. Este proceso de toma de muestra se repitió durante 5 veces a intervalos de 20 minutos (en 100 minutos).

Las muestras fueron analizadas siguiendo el método descrito de cromatografía de gas líquido en la sección 3.2.3., figura No. 1.



Parrilla Magnética

Figura No. 2. Esquema del equipo empleado en el estudio de la absorción In Vitro para el DIZ y el Diazepam



Parrilla Magnética

Figura No. 2. Esquema del equipo empleado en el estudio de la absorción In Vitro para el DIB y el Diazepam

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1. Método Analítico.

En esta parte se presentan las condiciones cromatográficas, la linealidad, el porcentaje de recuperación y la reproducibilidad obtenida de la validación del método analítico para cuantificar el 3,5-Difenil isoxazol en orina y en solución Krebs Ringer.

4.1.2. Condiciones Cromatográficas.

Para conocer las condiciones cromatográficas del DIZ se inyectó al cromatógrafo una solución clorofórmica con una concentración de 100 µg/ml del DIZ hasta tener las condiciones cromatográficas adecuadas para la cuantificación del DIZ (temperatura de la columna 165°C, temperatura del inyector 210°C, temperatura del detector 210°C flujo de nitrógeno 30 ml/min). En la figura No. 3 se presenta un cromatograma típico que se obtuvo al analizar una muestra clorofórmica del DIZ. En la figura No. 4 se presenta un cromatograma del DIZ al analizar una muestra clorofórmica con el patrón interno (octadecanol) se señala con el número I el pico del patrón interno con un tiempo de retención de 4.0 minutos, con el número II el DIZ con un tiempo de retención de 8.30 minutos.

4.1.3. Linealidad del método Analítico.

Para conocer la linealidad del método analítico en

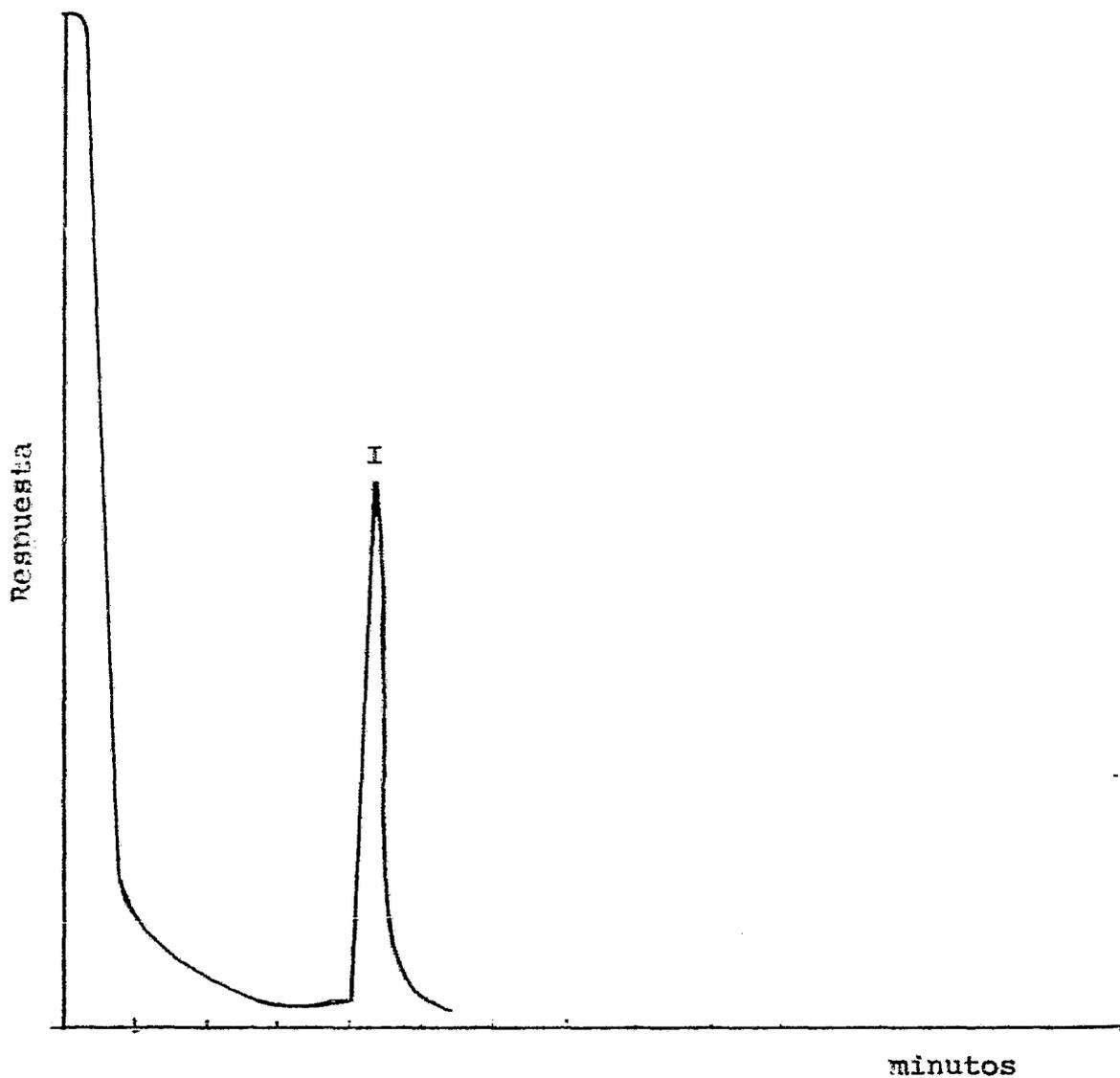


Figura No. 3. Cromatograma del DIZ (I) con un tiempo de retención de 8.3 minutos, en una columna SE-30 al 1% sobre cromosorb W.H.P. 80/100, a una temperatura de la columna de 165°C.

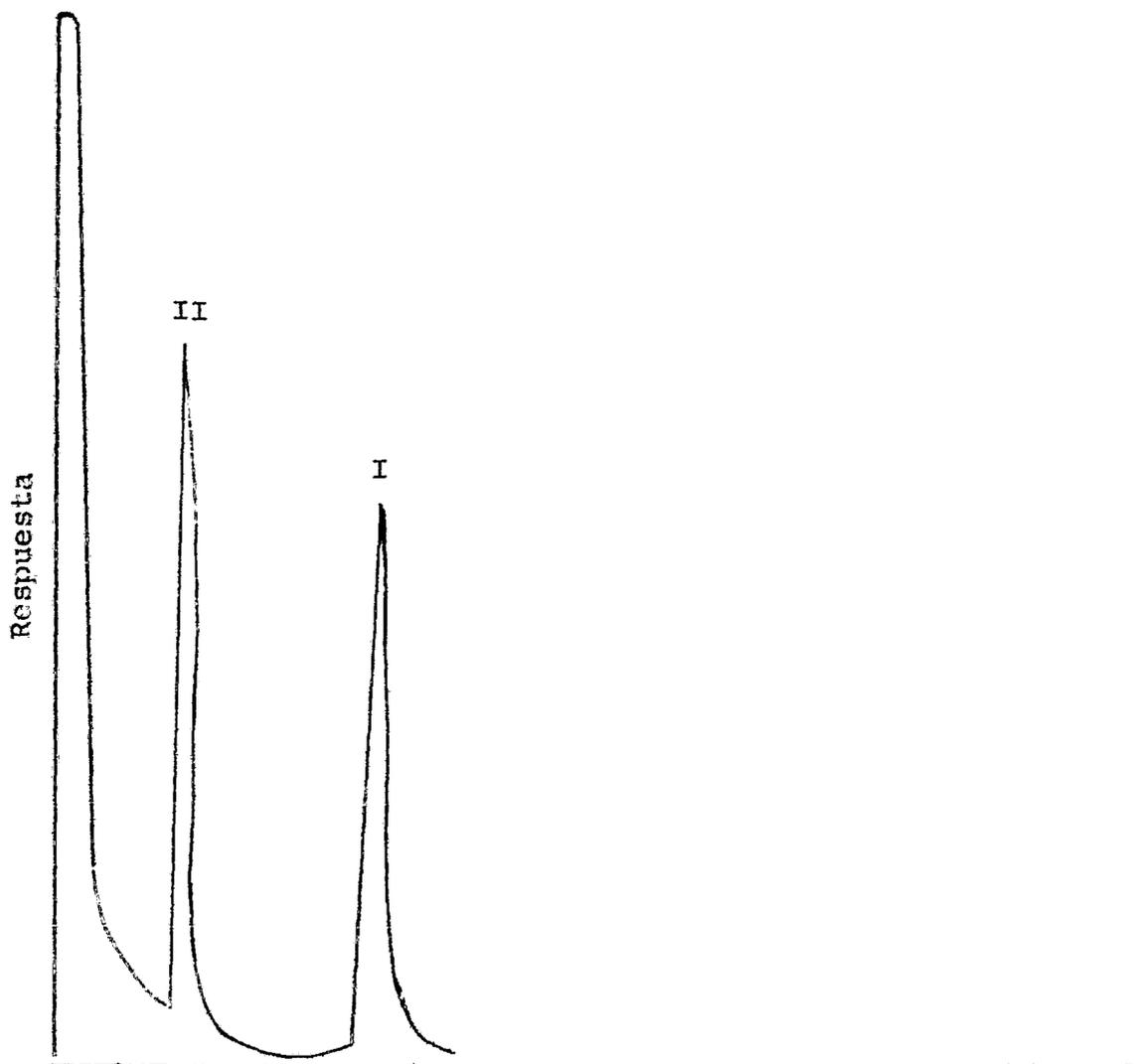


Figura No. 4. Cromatograma del DIZ (I) con tiempo de retención de 8.3 minutos, y del estándar interno (II) con un tiempo de retención de 4.0 minutos.

el intervalo de concentraciones de 2.5 a 15.0 $\mu\text{g/ml}$, se realizaron un total de 6 curvas patrón del 3,5-Difenil isoxazol en orina, las cuales fueron analizadas para obtener el coeficiente de correlación (r). Mediante el análisis de mínimos cuadrados utilizando la relación de alturas se obtuvo la ecuación de la línea recta con pendiente (m) y el intercepto al origen (b) de cada una de las curvas patrón. En la Tabla III se puede observar la correlación de cada una de las curvas patrón ($r = 0.99$), esto indica que el método tiene buena linealidad en el intervalo de concentraciones de: 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 $\mu\text{g/ml}$ del DIZ. En la figura No. 5 se presenta una curva patrón del DIZ en orina.

4.1.4. Porcentaje de Recuperación.

Para obtener el porcentaje de recuperación del 3,5-Difenil isoxazol en orina, en el intervalo de concentraciones de 2.5 a 15.0 $\mu\text{g/ml}$, se realizaron 6 curvas patrón del DIZ, 3, en cloroformo y 3 en orina. Las curvas patrón tanto las de cloroformo como las de orina fueron estudiadas mediante un análisis de mínimos cuadrados utilizando la relación de alturas se obtuvo la ecuación de la línea recta con pendiente (m), intercepto al origen (b) de cada una de las curvas patrón; relacionando la pendiente de la curva patrón en cloroformo al cociente y con la pendiente de la curva patrón en orina se obtuvo el porcentaje de recuperación para cada curva pa-

TABLA III. Coeficiente de correlación y curvas de regresión lineal obtenidas por el método de mínimos cuadrados a partir de curvas patrón del DIZ en orina.

Curva Patrón	Coeficiente de correlación (r)	Pendiente (m)	Intercepto al Origen (b)
1	0.994	0.0120	0.0001
2	0.999	0.0125	0.001
3	0.996	0.0120	0.002
4	0.995	0.0129	0.006
5	0.998	0.0125	0.006
6	0.997	0.0127	0.006

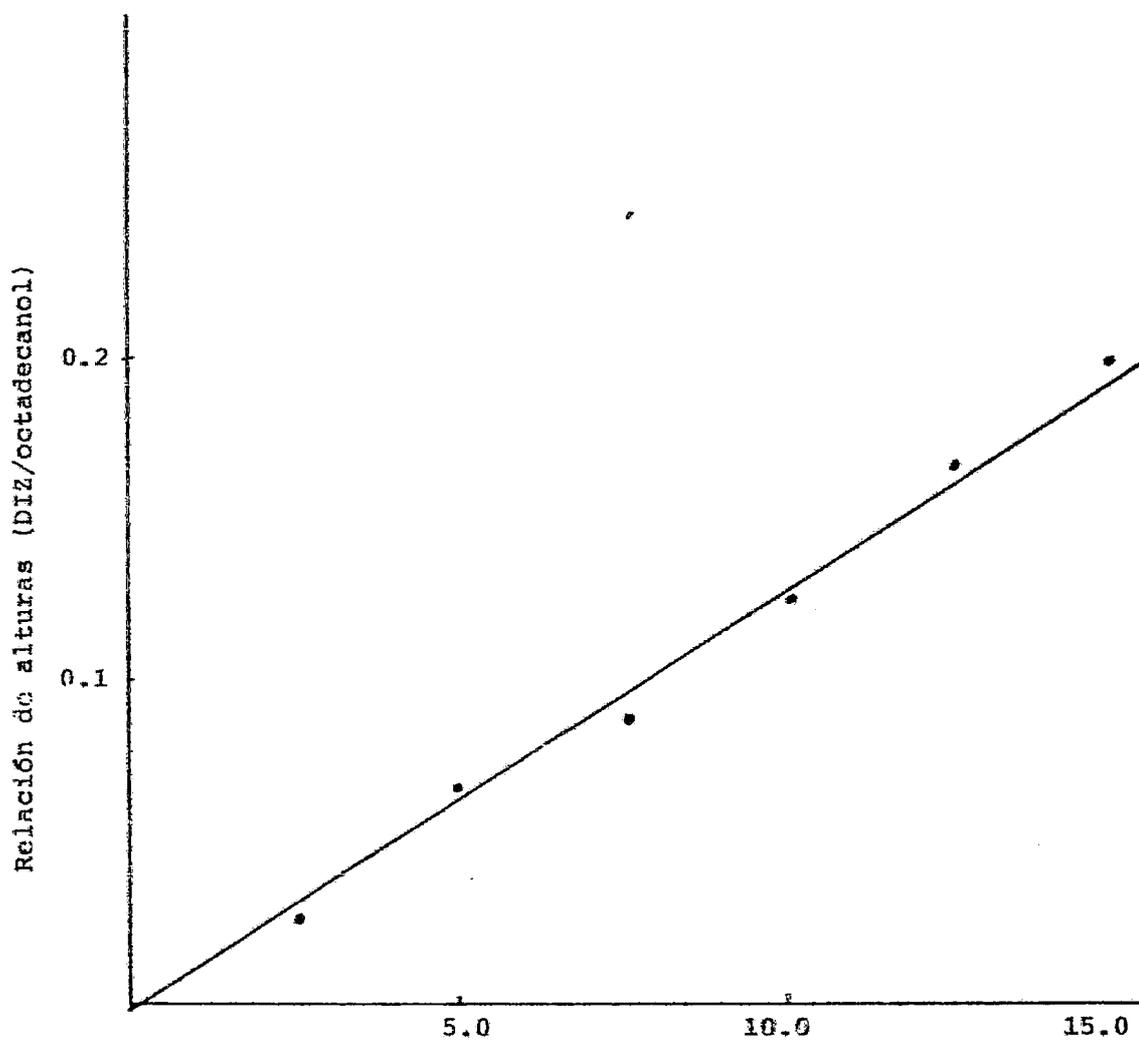


Figura No. 5. Curva patrón del DIZ en orina ($r = 0.997$)

TABLA IV. Porcentaje de recuperación del 3,5-Difenil isoxazol en orina, a partir de la relación de pendientes de las curvas patrón en cloroformo y en orina.

Curva patrón	Pendiente (m)		% de recuperacion (orina/cloroformo).
	Cloroformo	Orina	
1	0.0121	0.0124	102.0
2	0.0123	0.0128	104.0
3	0.0124	0.0125	100.8
\bar{x}			102.3

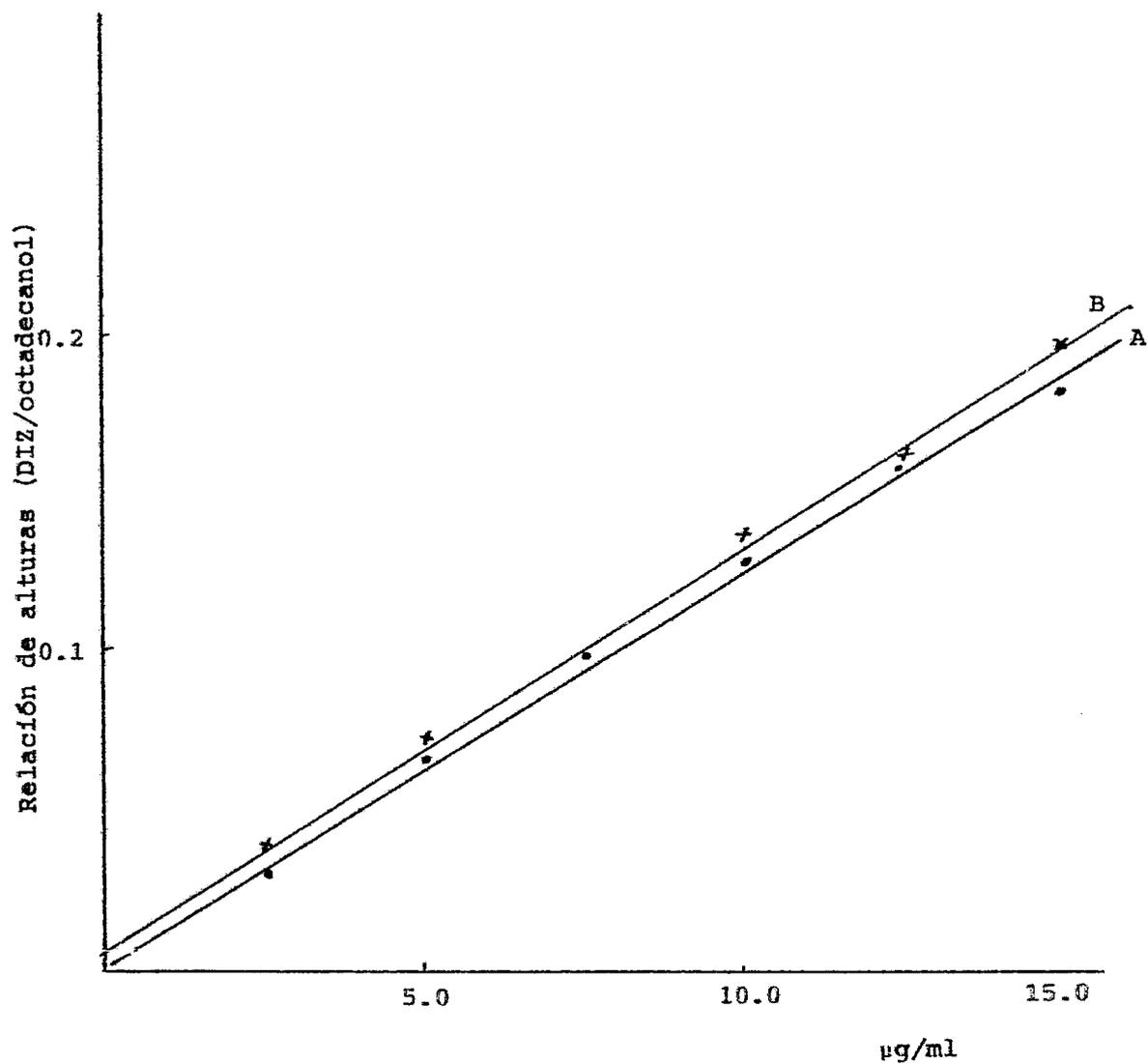


Figura No. 6. Porcentaje de recuperación del DIZ en orina. A en CHCl_3 ($r = 0.999$), B en orina ($r = 0.998$).

trón en orina. Como puede observarse en la Tabla IV el porcentaje de recuperación es de $102 \pm 2\%$. En la figura No. 6 se presenta una curva patrón en cloroformo y una en orina con un coeficiente de correlación de 0.999 y 0.998 respectivamente.

4.1.5. Reproducibilidad del Método Analítico.

Para conocer la reproducibilidad del método analítico, se analizaron un total de 6 curvas patrón del 3,5-Difenil isoxazol en orina (concentraciones de 2.5 a 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del DIZ). En la Tabla V se presenta la reproducibilidad del método analítico obtenida de la relación de alturas en los diferentes intervalos de concentración de las curvas patrón del DIZ en orina efectuadas en diferentes días, se calculó la media aritmética (\bar{X}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación expresado en porcentaje, en el intervalo de concentraciones de: 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del 3,5-Difenil isoxazol.

4.1.6. Linealidad y Reproducibilidad del Método Analítico para la cuantificación del 3,5-Difenil isoxazol en solución Krebs Ringer.

Para conocer la linealidad del método analítico en el intervalo de concentraciones: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, se realizaron 4 curvas patrón del 3,5-Difenil isoxazol en solución Krebs Ringer, las cuales fueron analizadas para calcular el coeficiente de correlación, mediante un análisis de mínimos cuadrados utilizando la rela-

TABLA V. Reproducibilidad del método de cromatografía gas licuado para la cuantificación del 3,5-Difenil isoxazol en orina, realizado en 6 días diferentes.

Concentración ng/ml	Relación de alturas (DIZ patrón interno)		
	Media (\bar{X}) (n = 6)	Desviación estándar (s)	Coefficiente de variación (%)
2.5	0.029	0.002	7.7
5.0	0.060	0.002	3.1
7.5	0.086	0.003	3.1
10.0	0.116	0.004	3.8
12.5	0.153	0.008	5.4
15.0	0.186	0.004	2.1

ción de alturas se obtuvo la ecuación de la línea recta con pendiente (m), intercepto al origen (b) para cada una de las curvas patrón como puede observarse en la Tabla VI la correlación de cada una de las curvas patrón es mayor de 0.97 en el intervalo de concentraciones de: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 $\mu\text{g/ml}$ del 3,5-Difenil isoxazol. En la figura No. 7 se observa una curva patrón del DIZ en solución Krebs Ringer, con un coeficiente de correlación de 0.994.

Para conocer la reproducibilidad del método se analizaron las 4 curvas patrón del DIZ en solución Krebs Ringer descritas anteriormente, se calculó la media aritmética (\bar{X}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación expresado en por ciento. Como puede observarse en la Tabla VII el coeficiente de variación promedio obtenido en el intervalo de concentraciones de: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 $\mu\text{g/ml}$ fué de 11.6%.

4.2. Linealidad y Reproducibilidad del Método Analítico para la cuantificación del Diazepam en solución Krebs Ringer.

Para conocer la linealidad del método analítico se analizaron un total de 3 curvas patrón de Diazepam en solución Krebs Ringer las cuales fueron analizadas para obtener el coeficiente de correlación. Mediante un análisis de mínimos cuadrados, utilizando la relación de alturas se obtuvo la ecuación de la línea recta con pendien

te (m), intercepto al origen (b) para cada una de las curvas patrón. Como puede observarse en la Tabla VIII la correlación de cada una de las curvas patrón es mayor de 0.99 en el intervalo de concentraciones de: 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$ de Diazepam. En la figura No. 8 se observa una curva patrón de Diazepam en solución Krebs Ringer.

Para conocer la reproducibilidad del método se analizaron 3 curvas patrón de Diazepam en solución Krebs Ringer, de las cuales se obtuvo la media aritmética (\bar{X}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de correlación expresado en por ciento. Como puede observarse en la Tabla IX el coeficiente de variación promedio en el intervalo de concentraciones de: 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 $\mu\text{g/ml}$ fué 3.3%.

TABLA VI. Coeficiente de correlación y curvas de regresión lineal obtenidas por el método de mínimos cuadrados a partir de curvas patrón del DIZ en solución Krebs Ringer.

Curva Patrón	Coeficiente de correlación (r)	Pendiente (m)	Intercepto de Origen (b)
1	0.989	0.0044	- 0.0001
2	0.993	0.0044	0.0004
3	0.975	0.0045	0.0006
4	0.994	0.0043	0.0004

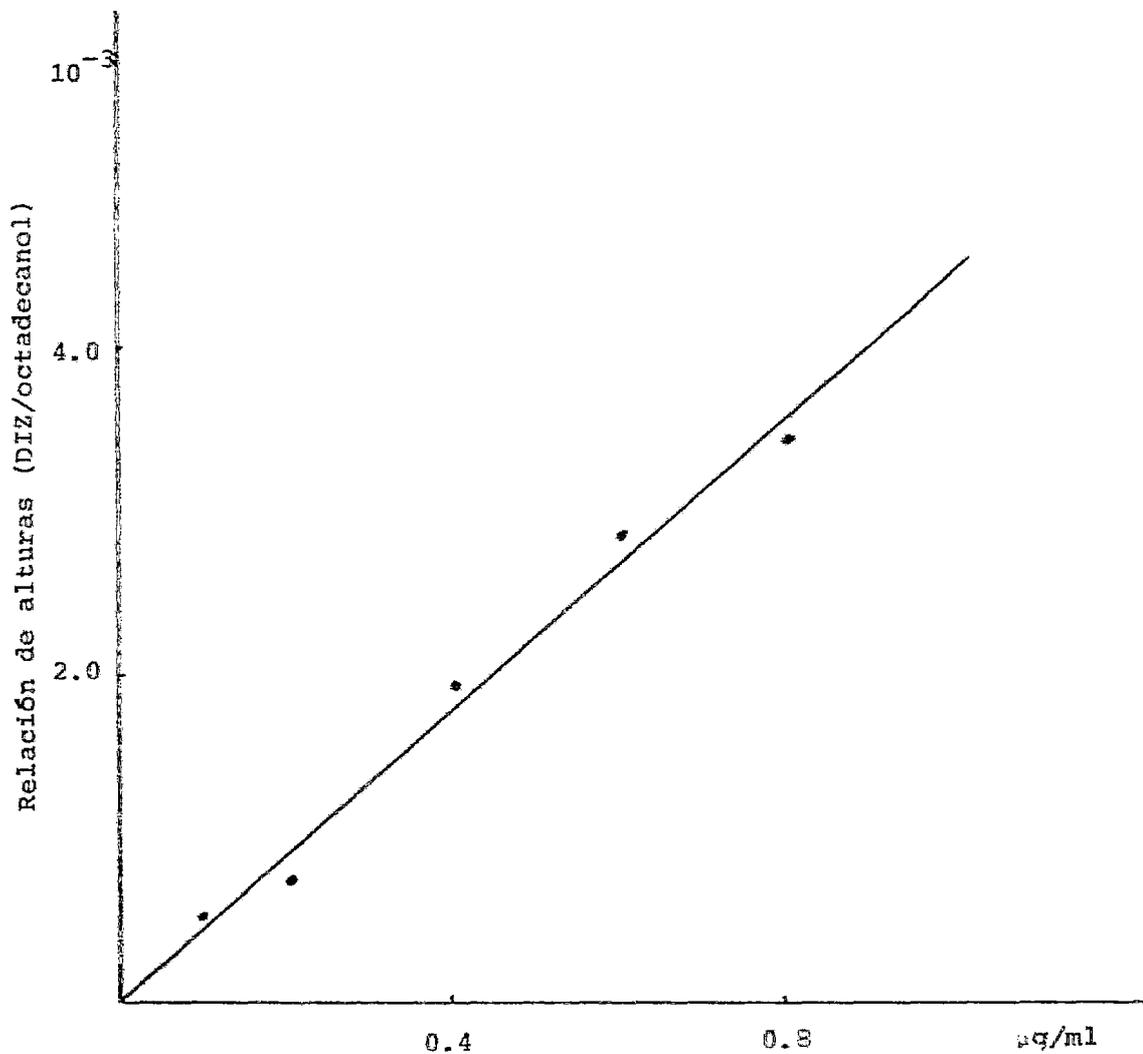


Figura No. 7. Curva patrón del DIZ en solución Krebs Ringer
($r = 0.994$).

TABLA VII. Reproducibilidad del método de cromatografía gas líquido para la cuantificación del 3,5-Difenil isoxazol en solución Krebs Ringer.

Concentración µg/ml	Relación de alturas (DIZ/Patrón interno)		
	Media (\bar{X}) n = 4	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
0.1	0.0004	0.0001	20.4
0.2	0.0009	0.0001	10.9
0.4	0.0016	0.0002	13.6
0.6	0.0026	0.0002	7.0
0.8	0.0036	0.0002	6.0

TABLA VIII. Coeficiente de correlación y curvas de regresión lineal obtenidas por el método de mínimos cuadrados a partir de curvas patrón de Diazepam en solución Krebs Ringer.

Curva Patrón	Coeficiente de correlación (r)	Pendiente (m)	Intercepto de Origen (b)
1	0.994	0.025	- 0.04
2	0.992	0.025	- 0.05
3	0.994	0.024	- 0.03

TABLA IX. Reproducibilidad del método de cromatografía gas líquido para la cuantificación de Diazepam en solución Krebs Ringer.

Concentración µg/ml	Relación de alturas (Diazepam/Patrón interno)		
	Media (\bar{X}) n = 3	Desviación estándar (s)	Coeficiente de variación (%)
5.0	0.093	0.006	6.0
10.0	0.208	0.010	4.9
15.0	0.310	0.006	2.0
20.0	0.479	0.007	1.4

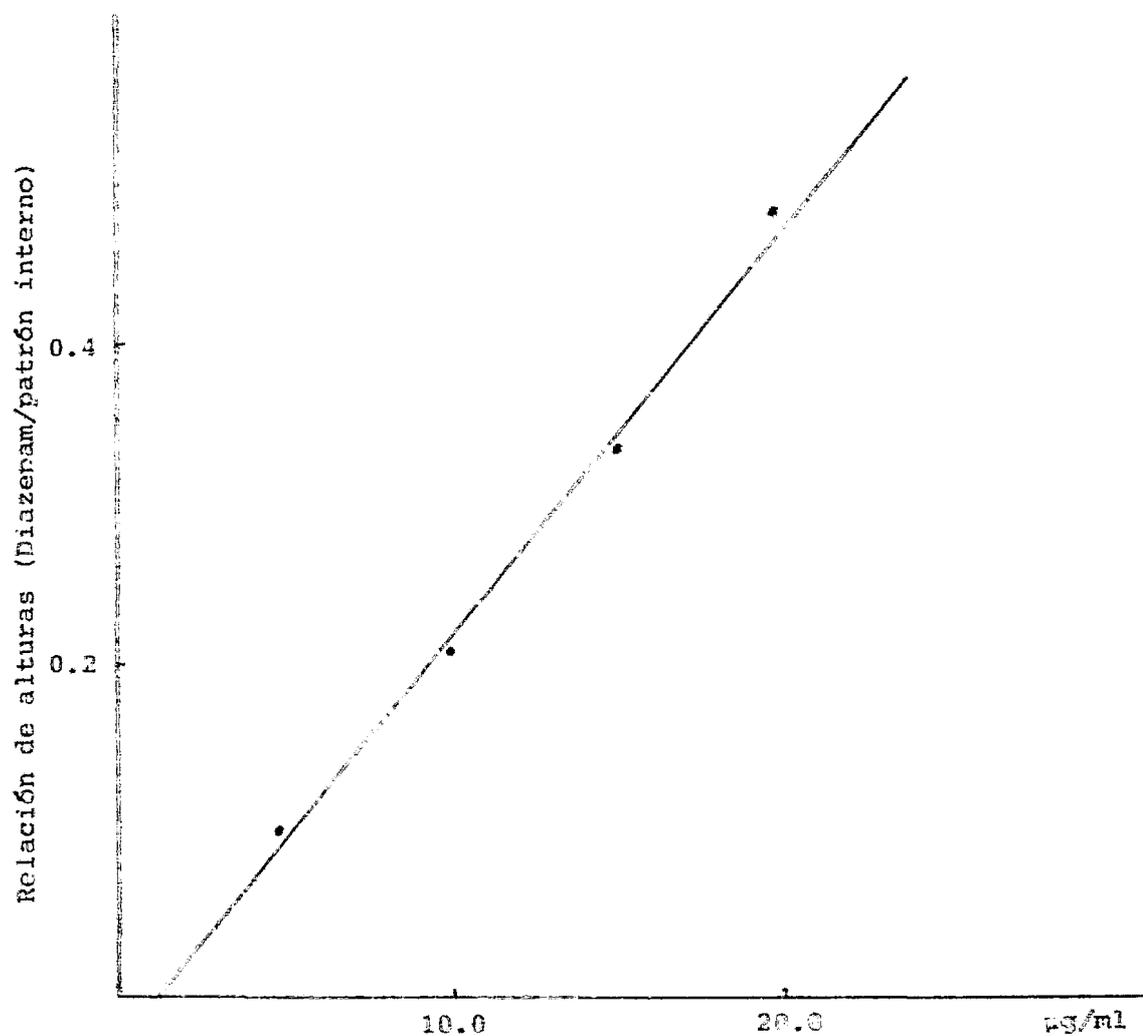


Figura No. 6. Curva patrón de Diazepam en solución Krebs Ringer
($r = 0.992$).

4.3. Absorción In Vivo.

Para el estudio de la absorción In Vivo del 3,5-Difenil isoxazol se usaron ratones machos, a los cuales se les administraron por vía intraperitoneal, dosis diferentes del 3,5-Difenil isoxazol en suspensión acuosa y en solución oleosa, se usaron dos como testigos (Nos. 8 y 20). Después de la administración intraperitoneal se colectaron muestras de orina y muestras de heces para cuantificar la cantidad excretada del 3,5-Difenil isoxazol. En la Tabla X se presenta la cantidad excretada del DIZ en orina después de 48 y 72 horas de la administración intraperitoneal de la suspensión acuosa y de la solución oleosa. En la Tabla XI se presenta la cantidad excretada del DIZ en heces después de 72 horas de la administración intraperitoneal de una dosis de 31.2 mg/kg en suspensión acuosa y en solución oleosa.

4.4. Absorción In Vitro.

Para conocer la absorción In Vitro del 3,5-Difenil isoxazol se determinó su coeficiente de permeabilidad por el método del intestino invertido de rata, al mismo tiempo se determinó la permeabilidad del Diazepam que fué utilizado como referencia. En las Tablas XII y XIII se presentan los coeficientes de permeabilidad del DIZ y del Diazepam respectivamente, se calcularon mediante la ecuación de Fick empleando los microgramos transferidos acumulados en segmentos de 10 centímetros de la porción del ye yuno del intestino invertido de rata.

TABLA X. Cantidad excretada del DIZ en orina después de la administración intraperitoneal del DIZ en diferentes dosis en suspensión acuosa y en solución oleosa.

Formulación	No. Ratón	Dosis (mg/Kg)	Microgramos excretados en orina	
			48 horas	72 horas
Suspensión Acuosa	1	7.8		-
	2	15.6		2.3
	3	31.2		2.97
	4	62.5		12.4
	5	31.2	-	
	6	"	1.1	
	7	"	-	
	8	-	-	
Solución Oleosa	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	"	1.0	
	19	"	2.5	
	20	-	-	

TABLA XI. Cantidad excretada del DIZ 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 DIZ en heces 72 horas
	9	761.5
Suspensión	10	872.9
Acuosa	11	623.6
	12	testigo
\bar{X}		752.7
s		101.1
	21	833.7
Solución	22	780.4
Oleosa	23	794.6
	24	testigo
\bar{X}		802.9
s		22.6

TABLA XII. Microgramos transferidos del DIZ en segmentos de 10 centímetros de la porción del yeyuno del intestino invertido de rata.

Concentración inicial ($\mu\text{g/ml}$)	No. Esp.	μg transferidos del DIZ en 100 min.	Coefficiente de permeabilidad (ml/min)
4.12	4	0.506	0.0012 ± 0.0008

TABLA XIII. Microgramos transferidos acumulados de Dizepam en segmentos de 10 cm de la porción del yeyuno del intestino invertido de rata.

$$C_0 = 100 \mu\text{g/ml.}$$

Tiempo	μg transferidos	μg transferidos acumulados	μg transferidos acumulados/ C_0
20	7.5	7.5	0.075
40	11.4	18.9	1.189
60	12.3	31.2	0.312
80	12.0	43.2	0.432
100	16.5	59.7	0.597

CAPITULO V

ANALISIS DE RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Método Analítico.

Existen en la literatura una gran variedad de métodos analíticos para determinar fármacos en fluidos biológicos (plasma, orina, heces, saliva, etc.). El método analítico seleccionado deberá ser sensible, específico, reproducible, exacto y lineal en el intervalo de concentraciones en que van a ser analizadas las muestras (6,23).

En este trabajo se empleó el método de cromatografía gas líquido, ya que es un método que nos permite cuantificar el 3,5-Difenil isoxazol en concentraciones del orden de microgramos por mililitro en un volumen relativamente pequeño de muestra.

Los resultados obtenidos del método analítico son satisfactorios como se puede observar en la sección de resultados. La linealidad del método en todas las curvas patrón del 3,5-Difenil isoxazol en orina, analizadas, es adecuada, pues se obtuvo un coeficiente de correlación mayor de 0.99 y en las curvas patrón analizadas en solución Krebs Ringer el coeficiente de correlación fué mayor de 0.97. En cuanto al porcentaje de recuperación del 3,5-Difenil isoxazol de orina se obtuvo el $102 \pm 2\%$. La reproducibilidad del método analítico del 3,5-Difenil isoxazol en orina fué adecuado con un coeficiente de variación

promedio de 4.2% en el intervalo de concentraciones: 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 $\mu\text{g/ml}$ y en solución Krebs Ringer el coeficiente de variación promedio fué de 11.6 en el intervalo de concentraciones de: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 $\mu\text{g/ml}$.

El método analítico para la cuantificación de Diazepam en solución Krebs Ringer fué satisfactorio como se observa en la sección de resultados, el coeficiente de correlación fué mayor de 0.99 y en las 3 curvas analizadas se obtuvo un coeficiente de variación promedio de 3.3% en el intervalo de concentraciones de: 5.0, 10.0, 15.0 y 20.0 $\mu\text{g/ml}$.

5.2. Estudio In Vivo.

La cantidad excretada del 3,5-Difenil isoxazol en muestras de orina y heces, después de la administración intraperitoneal a ratones, de las siguientes dosis diferentes: 7.8, 15.6, 31.2, 62.5 mg/kg del 3,5-Difenil isoxazol en dos formulaciones: suspensión acuosa y solución oleosa. En ambos casos no se excreta en la orina más de $1.2 \times 10^{-1}\%$ del DIZ administrado. En la figura No. 9 se presenta la relación lineal entre la dosis administrada del DIZ (7.8, 15.6, 31.2, 62.5 mg/kg) en solución oleosa y la cantidad excretada en orina, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.99, indicando que el DIZ sigue en este intervalo de dosis (7.8, 15.6, 31.2 y 62.5 mg/kg) una farmacocinética lineal (12, 24). En la figura No. 10

se observa que existe una tendencia hacia la relación lineal entre la dosis administrada del DIZ (7.8, 15.6, 31.2, 62.5 mg/kg) en suspensión acuosa y la cantidad excretada en orina a las 72 horas, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.96. La cantidad excretada promedio en las heces en las primeras 72 horas después de la administración intraperitoneal a 6 ratones de una dosis de 31.2 mg/kg del DIZ en suspensión acuosa y la misma dosis en solución oleosa, fue de 752 ± 101.1 y 603 ± 22.60 microgramos respectivamente, al comparar estos resultados se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas en la cantidad excretada promedio en heces del DIZ entre ambas formulaciones, pero las desviaciones estándar son diferentes estadísticamente ($p < 0.05$), lo cual indica que al administrar el DIZ en solución oleosa hay una absorción más uniforme. La cantidad excretada del DIZ tanto en orina como en heces es muy pequeña en relación a la dosis administrada, lo cual puede deberse a que el DIZ presente una absorción muy pobre.

5.3. Estudio In Vitro.

Actualmente existen numerosos reportes acerca del método del intestino invertido de rata, es un método valioso para predecir las características de absorción de una gran variedad de fármaco (24).

Kaplan y Cotler (13) encontraron que los compuestos que exhiben un tiempo de retraso (t_{lag}) de 3 a 18 minu-

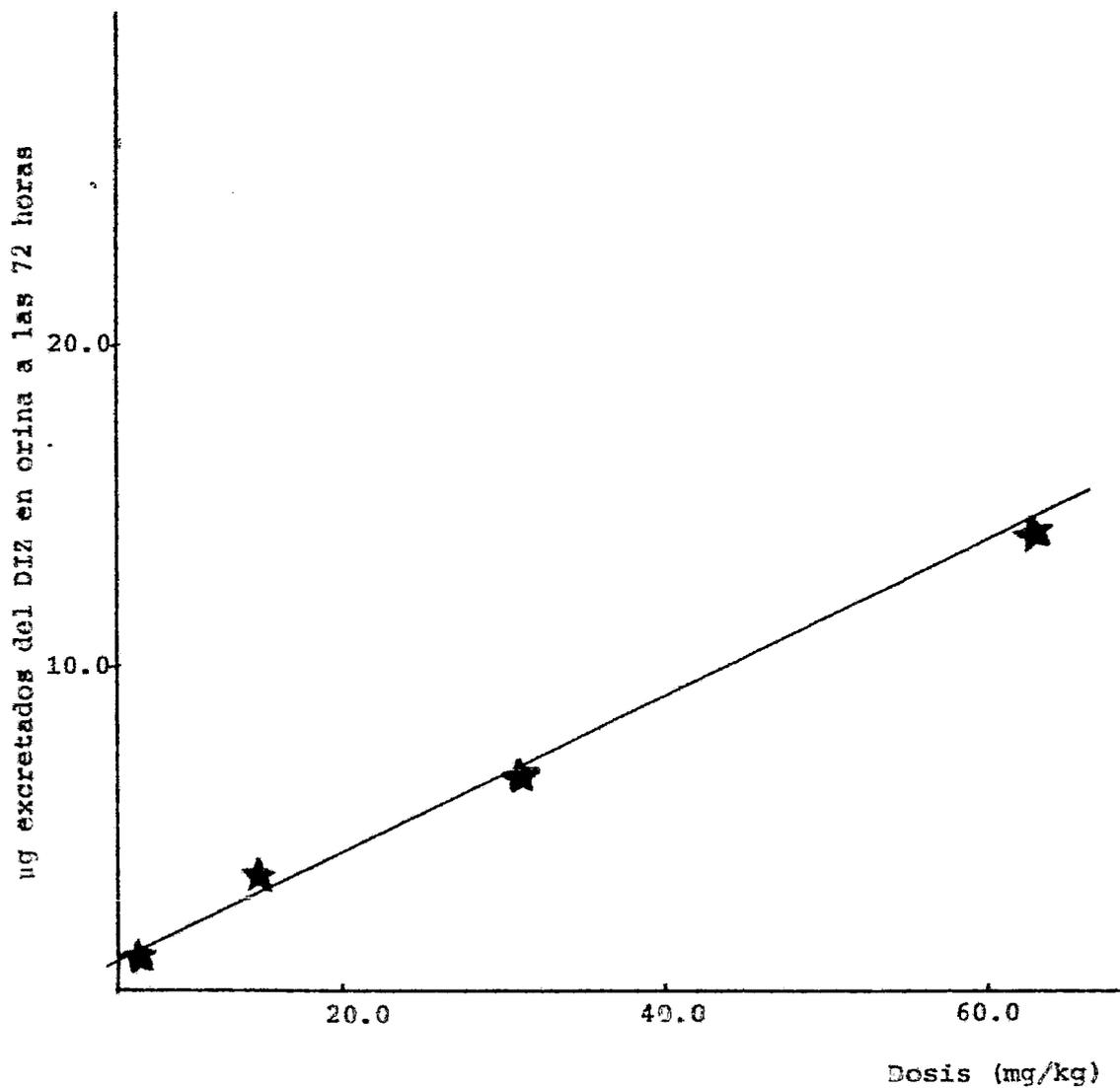


Figura No. 9. Relación entre la dosis (mg/kg) administrada a ratones por vía intraperitoneal en solución oleosa y la cantidad excretada en orina a las 72 horas.

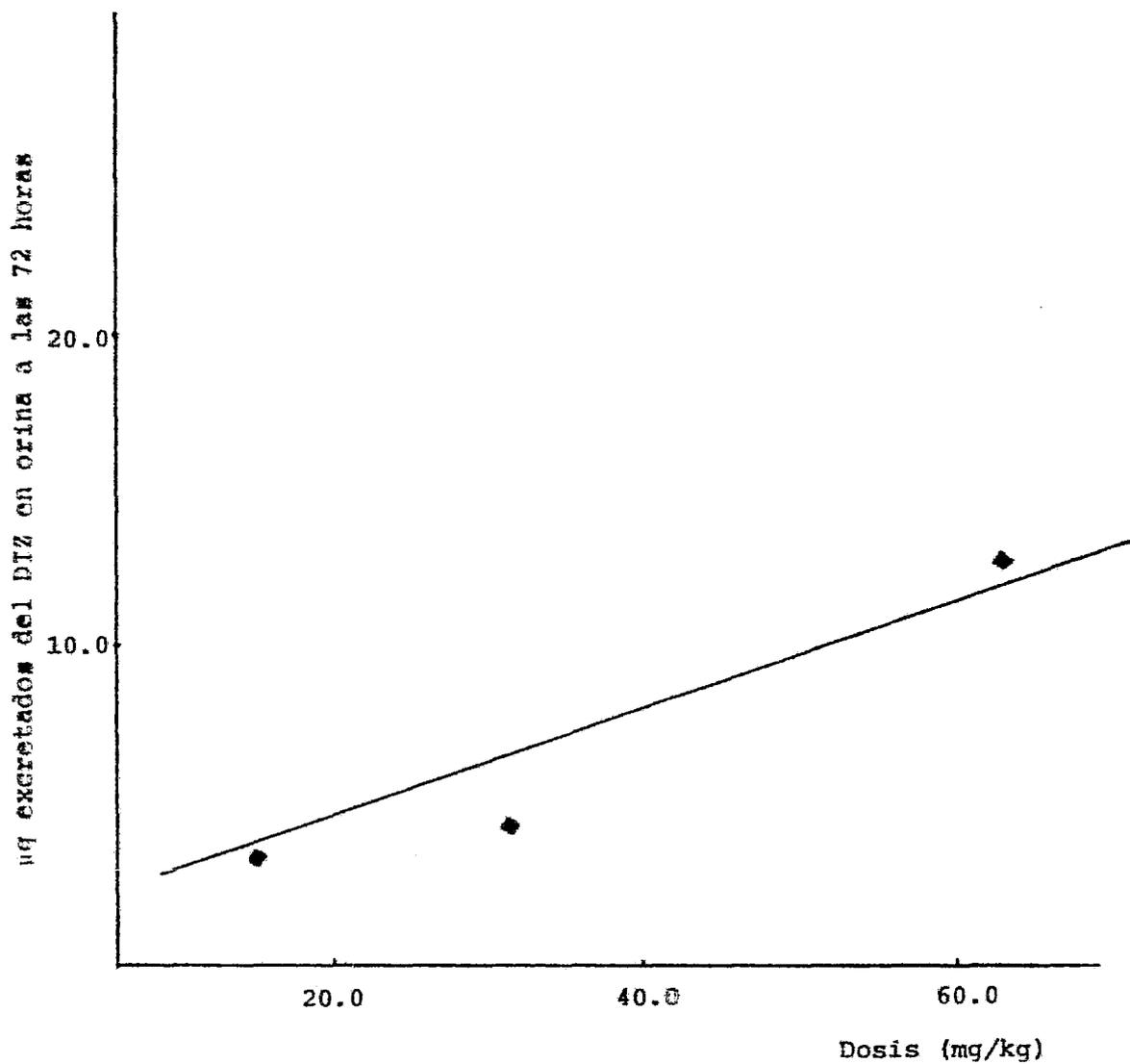


Figura No.10. Relación entre la dosis (mg/kg) administrada a ratones por vía intraperitoneal en suspensión acuosa y la cantidad excretada en orina a las 72 horas.

tos y un coeficiente de permeabilidad de 0.009 a 0.04 ml/min, no presentan problemas de absorción cuando se realizan estudios In Vivo, sin embargo los compuestos que exhiben un tiempo de retraso (t_{lag}) mayor de 60 minutos y un coeficiente de permeabilidad muy pequeño, presente problemas de absorción cuando se realizan estudios In Vivo, lo cual indica que la característica de permeabilidad es importante para predecir la absorción de un fármaco.

En esta parte del trabajo se estudió la permeabilidad del 3,5-Difenil isoxazol y la permeabilidad del Diazepam se utilizó como referencia. Se encontró que el DIZ tiene un coeficiente de permeabilidad de 0.0012 ± 0.0008 ml/min, el coeficiente de permeabilidad se calculó mediante la ecuación de Fick como se indica a continuación usando una sola concentración obtenida a los 100 minutos, ver Tabla XII.

$$\frac{dq}{dt} = \frac{kA (C_m - C_s)}{X} \quad \text{-----} \quad 1$$

Donde:

$\frac{dq}{dt}$ = Cantidad del fármaco difundido a través de la membrana por unidad de tiempo ($\mu\text{g}/\text{min}$)

k = Constante (cm^2/min)

A = Area de la membrana (cm^2)

C_m = Concentración del fármaco en la solución mucosal ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

C_s = Concentración del fármaco en la solución
serosal ($\mu\text{g/ml}$)

X = Grosor de la membrana (cm).

Asumiendo que A y X son constantes durante el estudio.

$$\frac{dq}{dt} = p (C_m - C_s) \quad \text{-----} \quad 2$$

donde:

$p = \frac{kA}{X}$, el cual se conoce como coeficiente de permeabilidad (ml/min).

si $C_m \gg C_s$

$$\frac{dq}{dt} = p C_m \quad \text{-----} \quad 3$$

despejando p :

$$p = \frac{dq/dt}{C_m}$$

substituyendo (ver datos en Tabla XII)

$$p = \frac{0.506 \mu\text{g}/100 \text{ min}}{4.12 \mu\text{g/ml}}$$

$$p = 0.0012 \text{ ml/min}$$

Como podemos observar el coeficiente de permeabilidad del DIZ es muy pequeño comparado con los coeficientes de permeabilidad de los fármacos estudiados por Kaplan y Cotler (13), lo cual indica que el DIZ se puede clasificar dentro de las sustancias que presentan problemas de absorción.

Como referencia se estudió el Diazepam, se encontró que exhibe un tiempo de retraso (t_{lag}) de 10 minutos y un coeficiente de permeabilidad de 0.006 ml/min. El t_{lag} se obtuvo gráficamente como se observa en la figura No.

11. El t_{lag} reportado por Kaplan y Cotler (13) es de 12 minutos, es similar al encontrado, sin embargo el coeficiente de permeabilidad reportado por estos autores es de 0.021 ml/min, lo cual indica que el resultado obtenido es inferior, esto puede ser debido a la gran variación biológica. Sin embargo para este trabajo fué satisfactorio puesto que el propósito fué determinar la reproducibilidad del método del intestino invertido de rata.

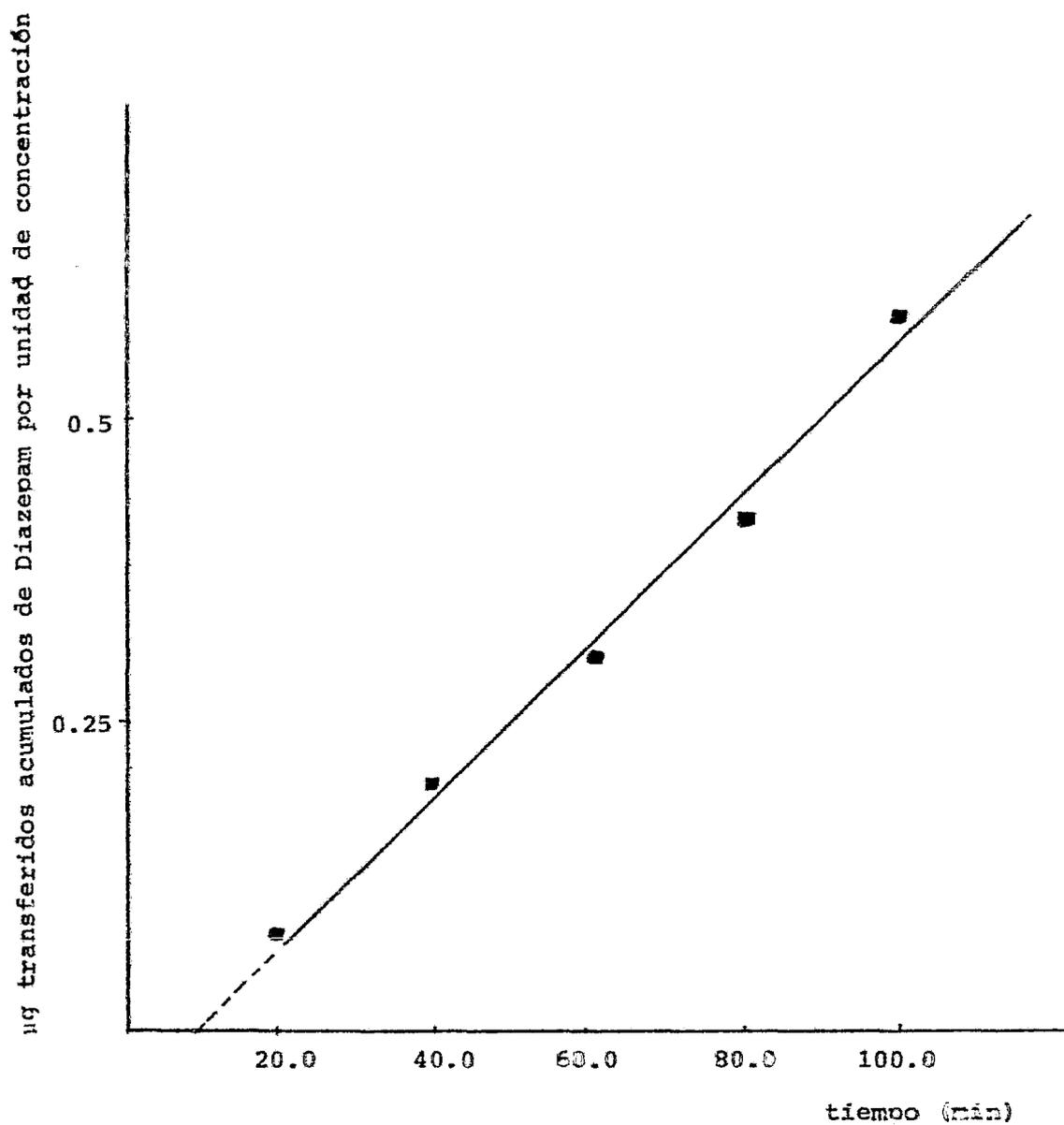


Figura No. 11. Cantidad transferida acumulada de Diazepam por unidad de concentración del fármaco en solución serosal, en función del tiempo.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

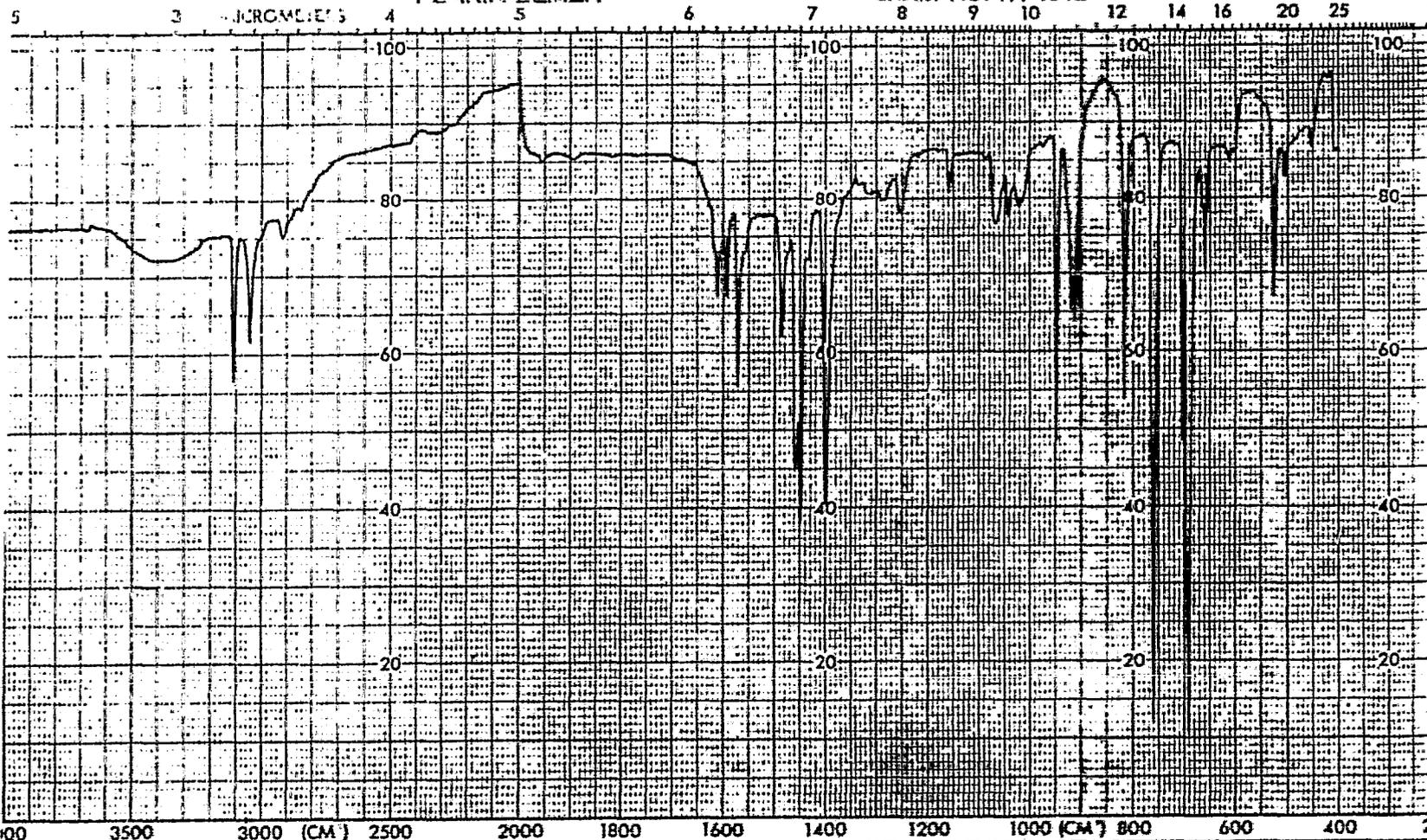
En relación al método analítico se puede concluir que por sus características de linealidad y precisión, el método de cromatografía gas líquido resultó adecuado para ser utilizado en la determinación del 3,5-Difenil isoxazol en muestras de orina y heces en el intervalo de concentraciones de: 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 $\mu\text{g/ml}$ y en solución serosal de: 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 $\mu\text{g/ml}$.

En el estudio In Vivo, en la administración intraperitoneal a ratones de dosis diferentes del DIZ en solución oleosa se encontró que existe una relación lineal entre la dosis administrada y la cantidad excretada en orina en los intervalos de dosis (7.8, 15.6, 31.2, 62.5 mg/kg) del DIZ, la farmacocinética del DIZ es lineal en estas dosis implicando esencialmente procesos cinéticos de primer orden en la absorción, distribución y eliminación.

En cuanto a la administración intraperitoneal de una dosis de 31.2 mg/kg en solución oleosa y en suspensión acuosa, se encontró que en ambas formulaciones no hay diferencias en la cantidad excretada, siendo de 803 ± 22.6 y 752 ± 101.0 μg respectivamente, en heces en las primeras 72 horas después de su administración, sin embargo las desviaciones estándar son diferentes estadísticamen-

te, cuando el DIZ es administrado en solución oleosa, la excreción es uniforme, estos resultados están de acuerdo con lo reportado en la literatura, donde indican que las soluciones oleosas son absorbidas uniformemente (16). El DIZ se excreta en forma inalterada en mayor proporción en heces que en orina y esto puede ser debido a su liposolubilidad (14). Hasta aquí los resultados indicarían que el DIZ podría tener problemas de absorción, y/o tener una vida media biológica muy larga.

En el estudio In Vitro se encontró que el DIZ tiene un coeficiente de permeabilidad muy bajo de 0.0012 ± 0.0008 ml/min lo que indica que el DIZ presenta problemas de absorción, lo cual confirma lo encontrado en el estudio de absorción In Vivo. Para determinar tanto la cantidad y la velocidad de absorción, como para evaluar la actividad antihelmíntica y la toxicidad se sugiere que se haga mediante una administración intravenosa, ya que el DIZ presenta problemas de absorción.



ABSCISSA		ORDINATE		SCAN TIME <u>10</u>	REP. SCAN <u>1</u> SINGLE BEAM
EXPANSION		EXPANSION		MULTIPLIER	TIME DRIVE <u>12</u>
SAMPLE <u>7</u>		% T <u>ABS</u>		SLIT PROGRAM <u>10</u>	OPERATOR <u>Mason</u> DATE <u>8-1-55</u>
ORIGIN		REMARKS <u>1.30576</u>		SOLVENT <u>KOH</u>	CELL PATH <u>-</u>
				CONCENTRATION <u>-</u>	REFERENCE <u>200</u>

BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar, J., Fifelski, J. "Effect. of pH on the In Vitro Absorption of Flufenamic Acid." J. Pharm. Sci. 55 (12): 1387-1391. 1966.
2. Akers, M.J. "Performulation Testing of Solid Oral Dosage Form Drugs Methodology, Management, and Evaluation" J. Pharm. Sci. 11 (1): 1-10. 1976.
3. Bevan, A.J. "Fundamentos de Farmacología" segunda edición. Harla. 1982.
4. Biagi, F. "Enfermedades Parasitarias" segunda edición. La prensa Médica Mexicana. 1982.
5. Carr, J.B., Kirby, P., Goodrow, M.H., Durham, H.G. "Novel Phosphate Anthelmintics 2-Aralkyl and Aralkenyl Analogs of Dichlorus" J. Med. Chem. 15 (12): 1231-1234. 1972.
6. Cabana, B.E. "Bioavailability - Pharmacokinetic Guidelines for ind Development" Presented at the 15 th Annual International Pharmacy Conference at Austin Texas. 1976.
7. Cabana, E.B., Ditter, W., Lewis. "Drug Absorption and Disposition as Monitors of Safety and Efficacy" J. Pharm. and Biopharm. 3 (2): 143-158. 1975.
8. Carr, J.B., Kendall, H.D. "Isoxazole Anthelmintics" J. Med. Chem. 20 (7): 934-939. 1977.
9. Chowhan, Z.T., Amaro, A.A. "Everted Rat Intestinal

- Sac as In Vitro Model for Assessing Absorptivity of New Drugs". J. Pharm. Sci. 66 (9): 1249-1253. 1977.
10. Crane, R.K., Wilson, T.H. "In Vitro Method for the Study of the Rate of Intestinal Absorption of Sugar" J. Appl. Physiol. 12: 145-146. 1958.
 11. Gibaldi, M., Grundhofer, B. "Drug Transport VI: Functional integrity of the Rat Everted Small Intestine with Respect to Passive Transfer." J. Pharm. Sci. 61 (1): 116-118. 1972.
 12. Gibaldi, M. "Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics Second Edition. Lea & Febiger. Philadelphia. 1977.
 13. Kaplan, S.A., Cotler, S. "Use of Cannulated Intestinal Sac for Serial Sampling as a Drug Absorbability (permeability Screen." J. Pharm. Sci. 63 (9): 1361-1365. 1972.
 14. La Du, Mendel, Way. "Fundamentals of Drug Metabolism and Disposition" Kriger. 1979.
 15. Leon, L.J., Cartensen, L.T. "Dissolution Technology" Copy right, Washington. 1974.
 16. Litter, M. "Farmacología" Sexta Edición, Ateno. 1980.
 17. Lovering, E.G., Black, D.B., "Drug Permeation through Membranes III: Effect of pH and Various Substances on Permeation of Phenylbutazone through Everted Rat Intestine and Polydinethylsilaxone." J. Pharm. Sci. 63 (5): 672-676. 1974.
 18. Sam, Frankel, Stanley. "Gradwohl's Clinical Labora-

tory Methods and Diagnosis" Seventh Edition, Vol. I
Copyright. 1970.

19. Rector, D.L., Fols, S.D., Conklin, R.D., Nowakowski, L.H. Kaugars, G. "Structure-Activity Relationships in a Broad Spectrum Anthelmintics Series acid Chloride Phenylhydrazone-1-aryl Substitutions and Chloride variations." J. Med. Chem. 24 (5): 532-538. 1981.
20. Otero, I.I., Proyecto de investigación "Síntesis y actividad biológica de derivados del Isoxazol" Departamento de Química Farmacéutica y Productos Naturales de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, U.N.A.M. y Centro Nacional de Parasitología Animal. (comunicación personal).
21. Send, H.G. Seth, D., 3-Aryl-5-Halomethylsoxazoles. A new class of Anthelmintics" J. Med. Chem. 9 (5): 431-433. 1966.
22. Smith, Fisher "Age Related Changes in the Clearance an oral Absorption of Sodio Cromoglycate in the developing Albino Rat. J. Pharm. Pharmacol. 32: 823-827. 1980.
23. Smith, R. Stewart, J. "Textbook of Biopharmaceutical Analysis. Lea & Febiger Philadelphia. 1981.
24. Swarbrick, J. "Current Concepts in the Pharmaceutical Sciences. Biopharmaceutics." Lea & Febiger Philadelphia. 1973.
25. Wagner, G.J. "Biopharmaceutics. Absorption Aspects."

J. Pharm. Sci. 50 (5): 359-387. 1961.

26. Wilson, H.T. Wiseman, G. "The use of sacs of everted Small Intestine for the Study of the Transference of Substances from the mucosal to the serosal surface." J. Physiol. 123: 116-125. 1954.