



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

TEMA DE TESIS

*EVALUACIÓN FARMACODINÁMICA Y FARMACOCINÉTICA  
DE NUEVAS FORMULACIONES Y ANÁLOGOS DE ALBENDAZOL  
CON POSIBLE ACTIVIDAD CISTICIDA*

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. FRANCISCA PALOMARES ALONSO



TUTOR: DRA HELGI JUNG COOK

2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# AGRADECIMIENTOS

---

---



- A mi tutora la Dra. Helgi Jung Cook por su enorme paciencia, sensibilidad e invaluable consejos y dedicación para lograr mi formación profesional.
  - A los miembros de mi comité tutorial integrado por el Dr. Manuel Soriano y el Dr. Vinicio Granados por las sugerencias recibidas durante el desarrollo de este trabajo por que sin ellas no hubiera sido posible su conclusión.
  - A mis padres y mis hermanos por estar conmigo en todo momento y apoyarme.
  - A Enrique por compartir la vida conmigo y llenarla de felicidad, paciencia y amor.
  - Al jurado revisor de ésta tesis: Dra. Inés Fuentes, Dr. Francisco Hernández, Dr. David Quintanar, Dr. Rogelio Pereda y especialmente al Dr. Vinicio Granados por sus excelentes observaciones y comentarios.
  - A la Universidad Nacional Autónoma de México.
  - Al Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”
  - Al CONACYT, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.
  - A mi querida amiga Guadalupe Palencia por su valiosa colaboración durante el desarrollo del trabajo experimental.
  - A mis compañeras Nelly Castro, Iliana González y Susana Rojas por apoyarme con sus atinadas sugerencias durante la escritura de éste manuscrito.
- 
-



Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Helgi Jung Cook en el  
laboratorio de Neuropsicofarmacología del  
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía  
“Manuel Velasco Suárez”  
México D.F.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de CONACYT  
(Beca No. 164590)



## ÍNDICE GENERAL

<i>Capítulo</i>	<i>Pág.</i>
Índice general	I
Índice de tablas	V
Índice de figuras	VI
Índice de esquemas	IX
Índice de abreviaturas	X
Resumen	XI
Abstract	XIII
1. Introducción	1
2. Antecedentes	5
2.1. <i>Taenia solium</i>	5
2.2. Neurocisticercosis	6
2.2.1. Epidemiología	7
2.2.2. Manifestaciones clínicas	8
2.2.3. Diagnóstico	8
2.2.4. Tratamiento	8
2.3. Cisticercosis murina causada por <i>Taenia crassiceps</i>	9
2.3.1. <i>Taenia crassiceps</i>	9
2.3.2. Semejanza de <i>Taenia crassiceps</i> con <i>Taenia solium</i>	10
2.3.3. Cisticercosis experimental	11
2.4. Albendazol	12
2.4.2. Acción farmacológica	14
2.4.3. Farmacocinética	14
2.4.4. Estudios de formulaciones con albendazol	17
2.4.5. Estudios de formulaciones con ciclodextrinas y albendazol	20
2.5. Ciclodextrinas	24
2.5.1. Absorción, metabolismo y eliminación	27
2.5.2. Toxicidad	27
2.5.3. Derivados de ciclodextrinas	28
2.5.4. Formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas	29
2.5.5. Efecto de las ciclodextrinas en la solubilidad y biodisponibilidad de fármacos	30

<b>Capítulo</b>	<b>Pág.</b>
2.5.6. Usos de las ciclodextrinas	31
2.5.7. Ciclodextrinas y polímeros hidrosolubles	33
2.6. Polivinilpirrolidona	35
2.6.1. Absorción, distribución y eliminación	36
2.6.2. Toxicidad	37
2.6.3. Efecto sobre la solubilidad y biodisponibilidad de los fármacos	37
2.6.4. Principales aplicaciones	39
2.7. Pectina	39
2.7.1. Tipos de pectinas	40
2.7.2. Absorción y eliminación	41
2.7.3. Seguridad	41
2.7.4. Efecto sobre la solubilidad y biodisponibilidad de los fármacos	42
2.7.5. Principales aplicaciones	42
3. Justificación del trabajo	44
4. Hipótesis	45
5. Objetivo general	46
5.1. Objetivos específicos	46
6. Parte experimental	47
6.1. Parte I. Evaluación de análogos de albendazol	48
6.1.1. Estudios de actividad cisticida	48
6.1.1.1. Reactivos y equipos	48
6.1.1.2. Preparación de soluciones y medio de cultivo	49
6.1.1.3. Evaluación de la actividad cisticida <i>in vitro</i> de los análogos de albendazol en cisticercos de <i>Taenia</i> <i>crassiceps</i> cepa ORF	50
6.1.1.4. Determinación de la CE <sub>50</sub> de los compuestos FHL18 y FHL19 en cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa WFU	52
6.1.1.5. Evaluación de la actividad cisticida <i>in vivo</i> en cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa WFU	52
6.1.1.6. Evaluación de la eficacia <i>in vivo</i> del análogo FHL18	53

<i>Capítulo</i>	<i>Pág.</i>
6.2 Parte II. Evaluación de formulaciones de albendazol con $\beta$ -ciclodextrina y polímeros hidrosolubles	
6.2.1. Reactivos y equipo	55
6.2.2. Estudio de eficacia cisticida de nuevas formulaciones de albendazol	56
6.2.3. Estudio de biodisponibilidad	
6.2.3.1. Desarrollo y validación del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma de rata	57
6.2.3.2. Estudio piloto de biodisponibilidad de albendazol en rata	62
6.2.3.3. Estudio de biodisponibilidad de nuevas formulaciones de albendazol	63
7. Resultados y discusión	
7.1. Parte I. Evaluación de análogos de albendazol	65
7.1.1. Estudios de actividad cisticida <i>in vitro</i>	65
7.1.1.1. Actividad cisticida de compuestos contra cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF	65
7.1.1.2. Actividad cisticida de compuestos contra cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa WFU	69
7.1.1.3. Determinación de la CE <sub>50</sub> de los compuestos FHL18 y FHL19	70
7.1.2. Estudios <i>in vivo</i> de actividad cisticida	71
7.1.2.1. Eficacia del análogo FHL18	73
7.1.3. Estudios de modelado molecular	74
7.1.3.1. Análisis conformacional	76
7.2. Parte II. Evaluación de formulaciones de albendazol con $\beta$ -ciclodextrina y polímeros hidrosolubles	
7.2.1. Estudios <i>in vivo</i> de actividad cisticida	81
7.2.2. Estudio de biodisponibilidad de formulaciones de albendazol con $\beta$ -ciclodextrina y polímeros hidrosolubles.	82
7.2.2.1. Validación de método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma de rata.	84

<i>Capítulo</i>	<i>Pág.</i>
7.2.2.2. Estudio piloto de biodisponibilidad de albendazol en rata	89
7.2.2.3. Estudio de biodisponibilidad de nuevas formulaciones de albendazol	91
8. Conclusiones	96
9. Perspectivas	97
10. Bibliografía	98
11. Anexos	109
1. Resúmenes de congresos	
2. Artículo publicado	
3. Artículo enviado a publicación	



## ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla no.</i>		<i>Pág.</i>
<b>Tabla 1.</b>	Propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas más comunes.	27
<b>Tabla 2.</b>	Complejos de inclusión con diferentes tipos de ciclodextrinas donde la biodisponibilidad se incrementa notablemente.	31
<b>Tabla 3.</b>	Formulaciones farmacéuticas donde se emplean ciclodextrina.	34
<b>Tabla 4.</b>	Grados de polivinilpirrolidona comercializados.	36
<b>Tabla 5.</b>	Estructura de los análogos de albendazol evaluados.	51
<b>Tabla 6.</b>	Actividad cisticida <i>in vitro</i> de sulfóxido de albendazol y de análogos de albendazol sobre cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.	68
<b>Tabla 7.</b>	Actividad cisticida <i>in vitro</i> de sulfóxido de albendazol y de análogos de albendazol sobre cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa WFU.	69
<b>Tabla 8.</b>	Valores de CE <sub>50</sub> <i>in vitro</i> de análogos de albendazol y de sulfóxido de albendazol sobre cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa WFU.	71
<b>Tabla 9.</b>	Estructura y actividad cisticida <i>in vitro</i> de sulfóxido de albendazol (SOALB) y de análogos de albendazol sobre cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> cepa ORF.	75
<b>Tabla 10.</b>	Valores obtenidos de la regresión Log de la relación de alturas de sulfóxido de albendazol y carbamazepina versus Log concentración de sulfóxido de albendazol.	86
<b>Tabla 11.</b>	Exactitud y precisión del método analítico.	87
<b>Tabla 12.</b>	Recobro absoluto del método analítico para cuantificar sulfóxido de albendazol.	88
<b>Tabla 13.</b>	Parámetros farmacocinéticos obtenidos después de la administración de las formulaciones de albendazol (10 mg/Kg).	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura no.</i>		<i>Pág.</i>
<b>Figura 1.</b>	Ciclo biológico de <i>Taenia solium</i> .	6
<b>Figura 2.</b>	Localización de cisticercos en el cerebro humano.	7
<b>Figura 3.</b>	Fórmula estructural del albendazol.	12
<b>Figura 4.</b>	Efecto del pH sobre la ionización del albendazol.	13
<b>Figura 5.</b>	Principales vías metabólicas de albendazol.	14
<b>Figura 6.</b>	Estructura de las tres ciclodextrinas más comunes: $\alpha$ -ciclodextrina, $\beta$ -ciclodextrina y $\gamma$ -ciclodextrina.	25
<b>Figura 7.</b>	Esquema del cono truncado correspondiente a una ciclodextrina.	26
<b>Figura 8.</b>	Representación esquemática de la formación de un complejo de inclusión de un fármaco con una ciclodextrina. K es la constante de asociación entre el fármaco y la ciclodextrina en una proporción 1:1.	29
<b>Figura 9.</b>	Estructura de vinil-pirrolidona y polivinilpirrolidona.	35
<b>Figura 10.</b>	Estructura básica de la pectina. n es el número de unidades básicas en el polímero y varía dependiendo del grado de polimerización.	40
<b>Figura 11.</b>	Estructuras de pectinas de alto metoxilo y de bajo metoxilo.	41
<b>Figura 12.</b>	Curso temporal de mortalidad de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> de la cepa ORF después de su incubación en 0.28 $\mu$ M de sulfóxido de albendazol y de análogos de albendazol. Cada punto representa el promedio de parásitos muertos $\pm$ DE (n=3).	66
<b>Figura 13.</b>	Curso temporal de mortalidad de cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> de la cepa ORF después de su incubación en 1.7 $\mu$ M de sulfóxido de albendazol y de análogos de albendazol. Cada punto representa el promedio de parásitos muertos $\pm$ DE (n=3).	67

<i>Figura no.</i>	<i>Pág.</i>
<b>Figura 14.</b> Curva concentración-respuesta de sulfóxido de albendazol y de los análogos activos en cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> de la cepa WFU. Cada punto representa el promedio de parásitos muertos $\pm$ DE (n=3).	70
<b>Figura 15.</b> Eficacia <i>in vivo</i> de albendazol sobre cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i> de la cepa WFU. Cada barra representa la media en la eficacia de cada dosis evaluada $\pm$ DE (n=6).	71
<b>Figura 16.</b> Eficacia cisticida <i>in vivo</i> de albendazol y del compuesto FHL18. Las barras representan la eficacia promedio $\pm$ DE (n=6).	73
<b>Figura 17.</b> Confórmeros de baja energía de sulfóxido de albendazol (1), JPV001 (2), FHL13 (3) y FHL14 (4). (a) Compuestos modelados. (b) Superposición de 1 (amarillo), 2 (azul marino), 3 (azul claro) y 4 (morado). El grupo metil-carbamato es planar en 1, mientras que el grupo carbamato en los compuestos 2-4 está fuera del plano debido al efecto alostérico de grupometilo que se colocó en la posición 1 ó 2.	77
<b>Figura 18.</b> Confórmeros de baja energía de sulfóxido de albendazol (1), FHL18 (5), FHL19 (6), NLB24 (7) y JVG40 (8). (a) Compuestos modelados. (b) Superposición de 1 (azul), 5 (azul claro), 6 (naranja), 7 (amarillo) y 8 (violeta). En todas las moléculas, excepto en la 7 y 8, los sustituyentes en la posición 5 fueron ortogonales al anillo bencimidazólico.	78
<b>Figure 19.</b> Eficacia cisticida de las diferentes formulaciones bajo estudio: Zentel, albendazol- $\beta$ -ciclodextrina, albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-pectina y albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-polivinilpirrolidona. Cada barra representa el valor promedio $\pm$ DE (n=6). * P< 0.05 contra el grupo tratado con Zentel.	81
<b>Figura 20.</b> Cromatogramas representativos de: (A) blanco de plasma, (B) plasma adicionado con carbamazepina, (C) plasma Adicionado con 400 ng/mL de sulfóxido de albendazol y carbamazepina, (D) muestra de plasma de rata después de 4 horas de la administración de albendazol (10 mg/Kg) y adicionada con carbamazepina.	85
<b>Figura 21.</b> Linealidad del método analítico. $RA_{SOALB/CBZ}$ es la relación de altura de sulfóxido de albendazol y carbamazepina.	86
<b>Figura 22.</b> Niveles plasmáticos de sulfóxido de albendazol versus tiempo (h) después de la administración oral de 15 mg/Kg de albendazol. Cada punto representa la media $\pm$ DE (n=2).	90

*Figura no.*

*Pág.*

**Figura 23.** Niveles plasmáticos de sulfóxido de albendazol versus tiempo (h) después de la administración de la formulación de albendazol-  $\beta$ - ciclodextrina, albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-polivinilpirrolidona y de Zentel. Se administró una dosis oral única de albendazol equivalente a 10 mg/Kg. Cada punto representa la media  $\pm$  EE (n=6).

91

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<i>Esquema no.</i>	<i>Pág.</i>
<b>Esquema 1.</b> Diagrama de trabajo utilizado en el proyecto.	47
<b>Esquema 2.</b> Preparación de la curva de calibración de sulfóxido de albendazol en plasma.	59
<b>Esquema 3.</b> Preparación de los puntos control de sulfóxido de albendazol en plasma.	59

**ÍNDICE DE ABREVIATURAS**

ABZ	Albendazol
SOALB	Sulfóxido de albendazol
CBZ	Carbamazepina
CD	Ciclodextrina
$\beta$ CD	$\beta$ -ciclodextrina
PEC	Pectina
PVP	Polivinilpirrolidona
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva que causa la muerte al 50 % de los parásitos
ABZ- $\beta$ CD	Formulación binaria de albendazol con $\beta$ -ciclodextrina 1:1 molar:molar
ABZ- $\beta$ CD-PEC	Formulación ternaria albendazol con $\beta$ -ciclodextrina 1:1 molar:molar y 5% de pectina (peso/peso)
ABZ- $\beta$ CD-PVP	Formulación binaria de albendazol con $\beta$ -ciclodextrina 1:1 molar:molar y 5 % de polivinilpirrolidona (peso /peso)
C <sub>max</sub>	Concentración plasmática máxima del fármaco
T <sub>max</sub>	Tiempo para alcanzar la concentración máxima del fármaco
AUC	Área bajo la curva obtenida de los niveles plasmáticos del fármaco versus el tiempo
DE	Desviación estándar
EE	Error estándar

## Resumen

A pesar de que el albendazol es el fármaco de elección para el tratamiento de la neurocisticercosis, su biodisponibilidad está limitada por su baja solubilidad en el tracto gastrointestinal, lo que da lugar a una enorme variabilidad en los niveles plasmáticos así como en la eficacia clínica. Ello crea la necesidad de investigar nuevas alternativas para el tratamiento de esta enfermedad. En este contexto, en el presente trabajo se emplearon dos estrategias: (a) La evaluación de nuevas moléculas con posible actividad cisticida y (b) La evaluación de nuevas formulaciones de albendazol. Para cumplir con la primera estrategia, se evaluó la actividad cisticida de siete nuevas moléculas, análogas del albendazol. El estudio *in vitro* se llevó a cabo empleando cisticercos de *Taenia crassiceps* de dos cepas diferentes: ORF y WFU, mientras que para evaluar la actividad *in vivo*, se empleó el modelo de cisticercosis por *Taenia crassiceps* cepa WFU. Como referencia se empleó el sulfóxido de albendazol (principal metabolito de albendazol). En la segunda estrategia, se evaluó la actividad *in vivo* de dos nuevas formulaciones de albendazol, conformadas como sistemas ternarios: albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-polivinilpirrolidona y albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-pectina. La evaluación de la eficacia se llevó a cabo en el modelo de cisticercosis murina utilizando una suspensión comercial (Zentel®) como producto de referencia. El estudio de biodisponibilidad de la formulación ternaria albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-polivinilpirrolidona se llevó a cabo en ratas Wistar. Para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma se utilizó un método de cromatografía de líquidos de alta resolución previamente validado. Los resultados mostraron que de las siete moléculas evaluadas, dos de ellas: FHL18 y FHL19 presentaron actividad cisticida *in vitro*, tanto en la cepa ORF como en la WFU. De igual forma, la actividad *in vivo* del compuesto FHL 18 fue equivalente a la del albendazol a una dosis equimolar. Los estudios de modelado molecular revelaron que

las características que debe tener un análogo de albendazol para presentar actividad cisticida son: Un átomo de hidrógeno en la posición 1, un grupo carbamato de metilo en la posición 2 y un sustituyente ortogonal al anillo benzimidazólico en la posición 5. Asimismo, la molécula debe adoptar una forma de “L” en el espacio para así poder interactuar con su sitio blanco: la beta-tubulina. En relación a las nuevas formulaciones estudiadas, se encontró que el sistema ternario albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-polivinilpirrolidona presentó la mayor eficacia cisticida. La biodisponibilidad de esta formulación fue significativamente mayor a la de la formulación comercial, lo cual se reflejó tanto en la velocidad como en la cantidad absorbida. Los resultados obtenidos en el presente trabajo señalan que tanto el compuesto FHL18 como la formulación albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-polivinilpirrolidona podrían representar dos nuevas opciones para el tratamiento de la neurocisticercosis.



## Abstract

Although albendazole is the drug of choice for neurocysticercosis treatment, its bioavailability is limited by its low solubility in the gastrointestinal tract. Therefore, a high inter-individual variability in plasma levels and in efficacy has been found. Thus the search of new alternatives for the treatment of this disease is still necessary. In this context, in the present study two different strategies were employed: (a) the evaluation of new molecules with possible cysticidal activity and (b) the evaluation of new albendazole formulations. In the first strategy, seven new analogues of albendazole were evaluated. To assess the *in vitro* cysticidal activity, *Taenia crassiceps* cysts strain ORF and WFU were used. Albendazole sulphoxide (main active metabolite of albendazole) was used as reference molecule. Murine cysticercosis caused by *T. crassiceps* strain WFU was used for the *in vivo* activity study, using albendazole as reference. In the second strategy, the *in vivo* cysticidal efficacy of two new ternary systems of albendazole with 1) albendazole- $\beta$ -cyclodextrin-polyvinylpyrrolidone and 2) albendazole- $\beta$ -cyclodextrin-pectin were evaluated. The efficacy was assessed using the murine cysticercosis model and a commercial suspension of albendazole (Zentel®) as reference product. The bioavailability study of the ternary formulation of albendazole- $\beta$ -cyclodextrin-polyvinylpyrrolidone was performed in Wistar rats. Plasma concentrations of albendazole sulphoxide were assayed using a validated high performance liquid chromatographic assay. Results showed that from the seven molecules, only two, FHL18 and FHL19, showed *in vitro* activity against cysts of strain ORF and WFU. Furthermore, the *in vivo* activity of FHL18 was equivalent to that exhibited by albendazole at the same equimolar dose. Molecular modeling studies revealed that the cysticidal activity depends on the presence on the molecule of a hydrogen atom at 1-position, a planar carbamate group at 2-position, and if the substituent at 5-position is

voluminous; it should be orthogonal to the benzimidazolic ring. Also, the molecule could adopt the “L” shape to accommodate into the cleft of  $\beta$ -tubulin. In regard to the new formulations, results showed that the ternary system of albendazole- $\beta$ -cyclodextrin-polyvinylpyrrolidone exhibited the highest efficacy. The bioavailability of this formulation was significantly higher than that obtained with the commercial formulation, which was reflected in the amount and the rate absorbed. The results of the present study suggest that both FHL18 and albendazole- $\beta$ -cyclodextrin-polyvinylpyrrolidone might be alternatives for neurocysticercosis treatment.

## 1. Introducción

La neurocisticercosis es la infección parasitaria más común del sistema nervioso central y es causada por la larva del céstodo *Taenia solium*. Las repercusiones que esta enfermedad tiene son importantes ya que ocasiona graves daños en la calidad de vida y productividad de los individuos infectados (Del Brutto, 2005). En la actualidad, la neurocisticercosis representa un serio problema de salud pública, no sólo en países en desarrollo de América latina, África y Asia, sino también en los Estados Unidos de América y en algunas naciones europeas que, como España, han experimentado recientemente un movimiento migracional masivo de gente proveniente de áreas endémicas (Wallin y col, 2004; Imirizaldu y col, 2004). En México, se ha calculado que el 12% de las intervenciones de neurocirugía son motivadas por la neurocisticercosis y hasta el 4% de las autopsias revelan la presencia de parásitos en el sistema nervioso central (García y col, 2002; Pérez-López y col, 2003). Fármacos como el praziquantel y más recientemente el albendazol ha provisto a los médicos de un tratamiento farmacológico para esta enfermedad. Estudios realizados en nuestro país han demostrado la superioridad del albendazol, por su mayor porcentaje de destrucción de quistes parenquimatosos (75-90%, frente al 60-70% del praziquantel) y por su capacidad de destruir quistes subaracnoideos (Imirizaldu y col, 2004; Del Brutto, 2005; Alarcón, 2006). Además, el albendazol es más económico y mejor tolerado que el praziquantel, por lo que es el fármaco de primera elección en el tratamiento de la neurocisticercosis. Sin embargo, debido a su baja solubilidad acuosa y absorción, en muchos de los casos se requieren altas dosis y larga duración del tratamiento, por lo que los regímenes terapéuticos se han modificado y se han intentado esquemas más cortos de tratamiento, con resultados parciales (García y col, 2002; Jung y col, 2008). Aunado a la eficacia variable del albendazol, se suman los diversos efectos adversos sobre el

sistema gastrointestinal que ocasionan las altas dosis y el uso prolongado de este fármaco (Del Brutto y col, 2006).

Considerando que la neurocisticercosis es una enfermedad que se presenta principalmente en países en vías de desarrollo, en los cuales los recursos son escasos, la investigación de nuevas formulaciones de albendazol o moléculas con actividad cisticida es pobre. Con el fin de disminuir la variabilidad en la respuesta terapéutica a este fármaco, se han desarrollado diferentes estrategias para mejorar su solubilidad y biodisponibilidad. Una de ellas ha sido el diseño de diferentes formulaciones que incluyen el uso de distintos surfactantes y tensoactivos (polisorbato 80, taurocolato de sodio, polietilenglicol y transcuto) (Redondo y col, 1998; Gaur y col, 2007), polímeros hidrosolubles (hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona) (Daniel-Mwambete y col, 2004; Gaur y col, 2007) y la complejación con ciclodextrinas. Diversos estudios han demostrado la utilidad de las ciclodextrinas para mejorar la biodisponibilidad y eficacia del albendazol, siendo una de las más utilizadas la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, la cual incrementa significativamente las concentraciones plasmáticas de sulfóxido de albendazol (principal metabolito activo de albendazol) y la eficacia de albendazol en diferentes modelos animales y contra diversas infecciones helmínticas (Castillo y col, 1999; García-Rodríguez y col, 2001; Evrard y col, 2002; Casulli y col, 2006). El complejo albendazol- hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina también ha sido evaluado en humanos por Rigter y col (2004) mostrando que la biodisponibilidad relativa de albendazol se incrementa hasta 9.7 veces comparada con las tabletas comerciales. Sin embargo, en la mayoría de los sujetos la ciclodextrina no fue bien tolerada. Por lo que se debe continuar con la investigación de métodos para mejorar la tolerancia de las ciclodextrinas.

Dentro de la clasificación de las ciclodextrinas naturales, la  $\beta$ -ciclodextrina es la que tiene menor costo, está más disponible en el mercado y su seguridad se ha comprobado en diversos estudios (Szejtli, 1987 y 1988; Yamamoto y col, 1990). Esta ciclodextrina también se ha empleado para incrementar la solubilidad de albendazol; sin embargo, su baja capacidad de solubilización limita su uso. Recientemente, se ha abordado la estrategia del uso de polímeros hidrosolubles para incrementar la capacidad solubilizante de la  $\beta$ -ciclodextrina en complejos fármaco-ciclodextrina. Tal es el caso de la glimepirida y el naproxeno, en los cuales el sistema ternario conteniendo  $\beta$ -ciclodextrina y polivinilpirrolidona muestra mayor eficiencia de disolución que el correspondiente sistema binario (Valero y col, 2003; Ammar y col, 2006).

A la fecha no se ha evaluado la utilidad de los sistemas ternarios con  $\beta$ -ciclodextrina y polímeros hidrosolubles sobre la biodisponibilidad y eficacia de albendazol. Por esta razón, recientemente en la Facultad de Química de la UNAM se prepararon dos sistemas ternarios con albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-pectina y albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-polivinilpirrolidona, los cuales podrían incrementar la biodisponibilidad y eficacia de este fármaco y representar una alternativa farmacéutica.

En relación a la investigación de nuevas moléculas con actividad cisticida, en los últimos años en la Facultad de Química de la UNAM se han dirigido los esfuerzos a la búsqueda de nuevas moléculas con potencial actividad cisticida. Dado que la actividad antihelmíntica de los benzimidazoles está relacionada con su unión preferencial a la tubulina helmíntica, se ha identificado que la actividad óptima de los carbamatos de benzimidazol se relaciona con el hidrógeno en la posición 1 del anillo benzimidazólico (Lancey, 1988). Con base en lo anterior, se han sintetizado nuevos compuestos análogos del albendazol con mejor solubilidad y algunos de ellos se han probado contra protozoarios como *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*, y contra helmintos como

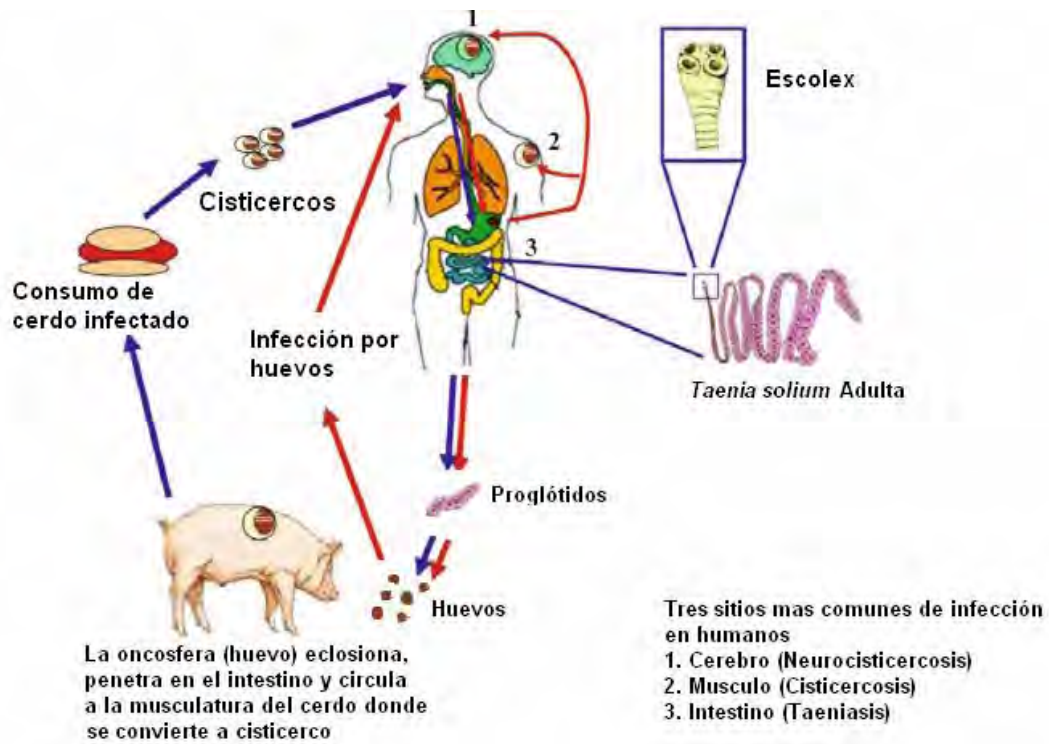
*Trichinella spiralis* (Váldez y col, 2002). A la fecha estos compuestos no han sido evaluados contra cisticercos de *Taenia* y dado que son análogos del albendazol, alguno de ellos podría representar una alternativa para el tratamiento de esta enfermedad.

## 2. Antecedentes

### 2.1. *Taenia solium*

El céstodo de *Taenia solium* es un gusano plano y segmentado que vive adherido al intestino delgado del hombre. En fase adulta mide de 3 a 8 metros. Posee una cabeza o escólex de 0.6 a 1 mm y un rostelo que presenta 22 a 32 ganchos en dos coronas, con los que se fija al intestino del huésped. En la parte final del céstodo, se ubica el estróbilo que es una cadena de proglótidos que contiene una gran cantidad de huevecillos esféricos que miden de 10 a 12 micras de diámetro, los cuales son expulsados en las heces del huésped. La fase larvaria de *Taenia solium* es el *Cisticercus cellulosae* y es una pequeña vesícula de aspecto translúcido, de forma esférica u ovoide que mide de 8 a 12 mm, y un punto blanco opaco que corresponde al escólex invaginado (Naquira, 1996).

El hombre es el único hospedero definitivo de la *Taenia solium* adulta, la cual llega al intestino delgado por la ingestión de carne contaminada con cisticercos, siendo el cerdo el hospedero intermediario de la forma larvaria (cisticercos). El ciclo biológico se inicia cuando la *Tenia* adulta desprende huevecillos y éstos son eliminados en las heces de un individuo parasitado. Estos huevecillos se dispersan en el ambiente, contaminando tierra, agua y alimentos. El cerdo al ingerir estos huevos desarrolla cisticercosis porcina y el hombre adquiere la cisticercosis sólo si los huevos alcanzan órganos o tejidos. En la figura 1 se presenta el ciclo biológico de la *Taenia solium*.



**Figura 1.** Ciclo biológico de *Taenia solium*.

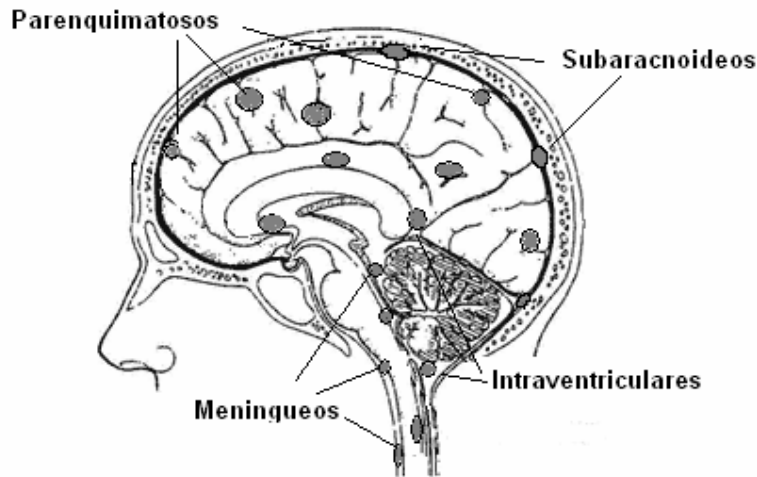
## 2.2. Neurocisticercosis

La neurocisticercosis es la enfermedad resultante de la infestación de la forma larvaria de la *Taenia Solium* en el sistema nervioso central. Esta enfermedad es adquirida por la ingestión de los huevos de la *Taenia* que son expulsados con las heces de un portador. En los seres humanos la exposición a los huevos se facilita por convivir con un portador de *Taenia Solium*. Se ha reportado que éste es el principal factor de riesgo para adquirir la cisticercosis o bien indirectamente por la ingestión de alimentos o agua contaminados con materia fecal de humano (Del Brutto y col, 2006).

Una vez en el organismo, la diseminación de los huevos es por vía vascular y, en cerebro específicamente, los parásitos pueden alojarse a nivel de parénquima,



ventrículos, meninges o una combinación de éstos (Alarcón, 2006) (Figura 2). Los cisticercos sufren cambios estructurales que incluyen diferentes etapas: la vesicular o quística, la coloidal, la granular nodular y la calcificada; esta última representa la forma no viable del parásito.



**Figura 2.** Localización de cisticercos en el cerebro humano.

### 2.2.1. Epidemiología

La Organización Mundial de la Salud calcula que cada año hay en el mundo más de 50,000 muertes por neurocisticercosis, aunque ésta podría ser una cifra subestimada. La prevalencia exacta de la neurocisticercosis es desconocida debido a que el diagnóstico sólo puede ser confirmado usando estudios de imagen y de líquido cefalorraquídeo, lo cual hace que los estudios epidemiológicos sean muy costosos (Alarcón, 2006). En México, estudios de autopsia han demostrado que del 2.5 al 3.6 % de la población tiene neurocisticercosis. La frecuencia de esta enfermedad en los hospitales de México es alta y se ha reportado que hasta el 8.6 % de los pacientes hospitalizados la presenta (Pérez-López y col, 2003; Imirizaldu y col, 2004). Después de la introducción de la tomografía computada y la imagen por resonancia magnética se incrementó el número de casos de

neurocisticercosis diagnosticados en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía de México. Esta patología es un verdadero problema de salud en México, pues el 25% de todos los procesos expansivos intracraneanos se deben a ella (Takayanagui, 2004; Velásquez-Pérez y col., 2004; Jiménez-Marcial y col., 2004).

### **2.2.2. Manifestaciones clínicas**

La neurocisticercosis es una enfermedad pleomórfica, debido a diferencias individuales en el número y localización de los parásitos, así como a la amplia variabilidad que existe en la respuesta inmune del huésped frente al parásito. Las manifestaciones clínicas son amplias, desde asintomáticas hasta cuadros neurológicos graves, representados por la epilepsia, síndrome de cráneo hipertensivo, afección de pares craneales, alteraciones motoras y fenómenos isquémicos. La epilepsia es la manifestación clínica más frecuente de ésta enfermedad, observándose en el 50 a 80% de los casos de neurocisticercosis parenquimatosa (Del Brutto, 2005; Alarcón, 2006).

### **2.2.3. Diagnóstico**

La neurocisticercosis se diagnostica por métodos de imagenología, como resonancia magnética o tomografía axial computarizada, los cuales tienen un elevado índice de confiabilidad. Otros métodos son los inmunológicos como ELISA en placa (Del Brutto, 2005).

### **2.2.4. Tratamiento**

El tratamiento de la neurocisticercosis debe ser individualizado, según el número, localización y viabilidad del parásito (forma quística (activa) o calcificada (inactiva)). El tratamiento puede ser sintomático, quirúrgico o farmacológico. El sintomático está

enfocado al control de crisis convulsivas, cefalea o cualquier otra manifestación. En éste, se recomienda el tratamiento con antiepilépticos y/o glucocorticoides. El tratamiento quirúrgico varía de acuerdo a la localización y a las características de la lesión secundaria, pudiendo consistir en la resección completa del parásito, la derivación ventricular y, en la actualidad, la endoscopia cerebral diagnóstica y terapéutica, la cual permite la extracción de los cisticercos del sistema ventricular y del espacio subaracnoideo. En relación al tratamiento farmacológico, se emplean los siguientes fármacos cisticidas: el praziquantel y el albendazol (ALB) (Del Brutto, 2005; Alarcón, 2006; Jung y col, 2008). El ALB es el fármaco de primera elección (15 a 30 mg/Kg/día durante 8 días) por su bajo costo, mayor permeación a través de la barrera hematoencefálica y no interacción con corticoesteroides, quedando como alternativa secundaria el praziquantel (50 mg/Kg/día durante 15 días) (Alarcón, 2006; Jung y col, 2008).

### **2.3. Cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps***

#### **2.3.1. *Taenia crassiceps***

La *Taenia crassiceps* es un céstodo común en el intestino del zorro rojo. La forma larvaria es el *Cisticercus longicollis* y se encuentra en varios roedores pequeños y en topos. El ciclo biológico de esta *Taenia* involucra al zorro como hospedero de la *Taenia* adulta y a pequeños roedores como hospederos intermediarios. El ciclo inicia cuando el zorro ingiere huevos de *Taenia crassiceps* presentes en las heces de otros caninos. Con la infección, los huevos atraviesan las membranas y al llegar al intestino son transportados vía sanguínea a todos los tejidos subcutáneos y a la cavidad abdominal. Una vez implantados se desarrollan a cisticercos, los cuales tienen un rápido incremento

en el tamaño y en algunas especies desarrollan una espesa estructura en la parte final del mismo, que constituirá el futuro escólex (Freeman, 1962).

Los cisticercos de *Taenia crassiceps* se pueden reproducir asexualmente por gemación cuando se encuentran en la cavidad peritoneal de diferentes especies de roedores. El metacéstodo desarrolla pequeños brotes exógenos, los cuales lentamente se desprenden, formando nuevos cisticercos. En infecciones a largo plazo el cisticerco puede medir de 2 a 5 por mm (Chernin, 1975 y 1977).

A la fecha, se ha explorado la capacidad infectiva de distintas cepas de cisticercos de *Taenia crassiceps*: ORF, KBS, HYG y WFU; estas dos últimas se distinguen por la presencia de escólex, mientras que la cepa ORF y la KBS carecen de éste (Freeman, 1962; Dorais, 1969; Fragoso y col, 2008).

### **2.3.2. Semejanza de *Taenia crassiceps* con *Taenia solium***

En general, las especies de *Taenia* comparten similitudes morfológicas, metabólicas y fisiológicas. En particular la *Taenia solium* y la *Taenia crassiceps* comparten las siguientes características:

- a) Ambas requieren de un huésped para su reproducción
- b) Su morfología es básicamente idéntica y está caracterizada por un surco que constituye un canal de alimentación
- c) Su patrón de crecimiento es estrobilar
- d) La diseminación de huevos es parte de su ciclo de vida
- e) Ambas especies poseen un tegumento que constituye una superficie esencial para la captación de nutrientes
- f) La proporción de los principales constituyentes como proteínas, lípidos y carbohidratos es semejante entre especies

- g) Las larvas de estos céstodos son particularmente ricas en glucógeno y sus niveles pueden alcanzar hasta el 50% de los componentes en base seca

Se ha reportado que la *Taenia solium* y la *Taenia crassiceps* contienen una proporción similar de glucógeno en la fase de metacestodo (25% y 27%, respectivamente) (Smyth, 1981). Siebert y col. (1978) describieron los cambios a nivel ultraestructural del larvas de *Taenia crassiceps* y *Taenia solium* ante la respuesta inmune del huésped y encontraron similitudes en la degeneración del tegumento asociada a la muerte de ambos parásitos. También se ha reportado que los cisticercos de *Taenia solium* comparten antígenos con los de *Taenia crassiceps*, por lo que esta semejanza permite utilizar los antígenos de *Taenia crassiceps* para el diagnóstico de neurocisticercosis en pacientes por ensayo inmunoenzimático e inmunoblot (Rossi y col, 2000; Pardini y col, 2002). Esto debido principalmente a que la dificultad de obtener cisticercos de *Taenia solium* de individuos naturalmente infectados, tales como los cerdos.

### **2.3.3. Cisticercosis experimental**

La cisticercosis se ha estudiado en el hombre, en el cerdo y en otros modelos experimentales entre los que se encuentra la causada por *Taenia taeniaeformis* en rata y ratón y la causada por *Taenia crassiceps* en ratón. Otro modelo que también se ha empleado es el de *Taenia pisiformis* en conejo. Sin embargo, este modelo tiene algunas desventajas, ya que es más caro y no ofrece la homogeneidad genética que proporcionan las cepas de roedores (Williams y col, 1982).

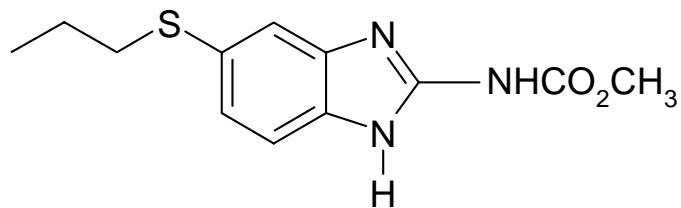
Debido a su capacidad de reproducción asexual, los cisticercos de *Taenia crassiceps* son fáciles de reproducir y de mantener en el laboratorio por inoculaciones seriadas en el peritoneo de ratones. Se ha reportado que en ratones blancos de las cepas CFLP, BDF1 y BALB/c existe una mayor susceptibilidad a la infección. Esta susceptibilidad se

presenta principalmente entre las 4 y 5 semanas de vida. Asimismo, se ha encontrado que las hembras desarrollan una mayor cantidad de cisticercos que los machos (Chernin, 1975 y 1977). La cepa BALB/c es la más utilizada en la infección experimental de muchos helmintos, ya que posee características inmunológicas apropiadas para el estudio de la relación huésped-parásito debido a que presenta las siguientes ventajas:

- a) La infección es de fácil inducción
- b) La inoculación de uno o más cisticercos permite la obtención de cientos de éstos en pocos días
- c) Los parásitos son grandes y se pueden extraer fácilmente del peritoneo de los ratones para su conteo

#### 2.4. Albendazol

El ALB es un benzimidazol carbamato con actividad anti-parasitaria de amplio espectro y se aprobó por primera vez para el tratamiento de infecciones helmínticas en borregos en 1977 y su uso en humanos se aprobó en 1983 (De Silva y col., 1997). Este compuesto es un polvo amorfo de blanco a amarillo, con un peso molecular de 265.33 ( $C_{12}H_{15}N_3O_2S$ ) (Figura 3) y un punto de fusión entre 208-210°C.

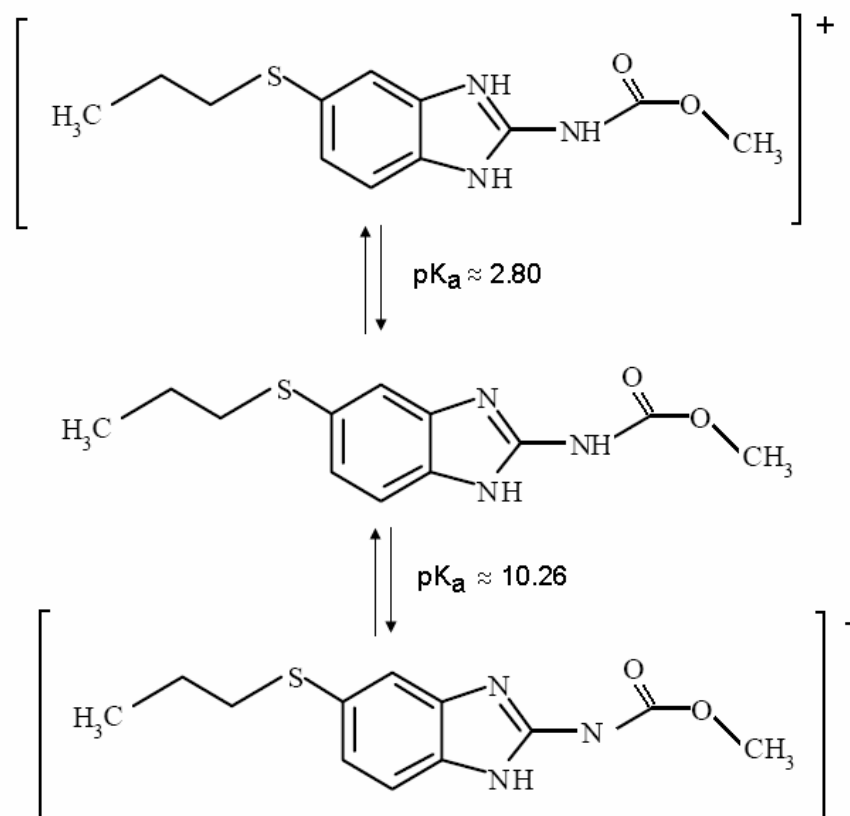


**Figura 3.** Fórmula estructural del albendazol.

Este compuesto es prácticamente insoluble en agua y alcohol, ligeramente soluble en éter y diclorometano, y completamente soluble en ácido fórmico anhidro, dimetilsulfóxido y ácido acético (Jung y col, 1998).

En México se vende comercialmente en forma de tabletas y/o suspensión, bajo los nombres de Digezanol, Eskazole, Farmiver, Lurdex, Vermin-plus y Zentel.

Es una molécula anfiprótica tiene dos valores de pKa: 10.47 y 2.90. El primer valor de pKa se atribuye a la pérdida del protón del grupo amino en la posición 1 del anillo benzimidazólico y el segundo valor se atribuye a la protonación del nitrógeno en la posición 3 del anillo benzimidazólico (Jung y col, 1998). La figura 4 muestra el efecto del pH sobre la ionización del ALB.



**Figura 4.** Efecto del pH sobre la ionización del albendazol.

### 2.4.1. Acción farmacológica

El ALB posee actividad frente a tremátodos, céstodos y nemátodos. Es útil en dosis única en infecciones como ascariasis, trichuriasis, enterobiasis e infecciones contra gusanos planos. En dosis múltiples se usa para el tratamiento de estrogiloidiasis, trichostrongiliasis, infecciones por céstodos como hidatidosis, teniasis y neurocisticercosis. Se usa también contra infecciones como toxicariasis, trichinosis, himenolepiasis y filariasis (en combinación con otros antihelmínticos) (Pérez-Serrano y col, 1994; Bennett, 2000). En México se usa para el tratamiento de *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermicularis*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*, *Taenia* sp., *Chlonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini*, Giardiasis (*Giardia lamblia*, *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis*) y Gnathostomiasis (causada por *Gnathostoma spinigerum* y especies relacionadas) (Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables, 2007).

### 2.4.2. Farmacocinética

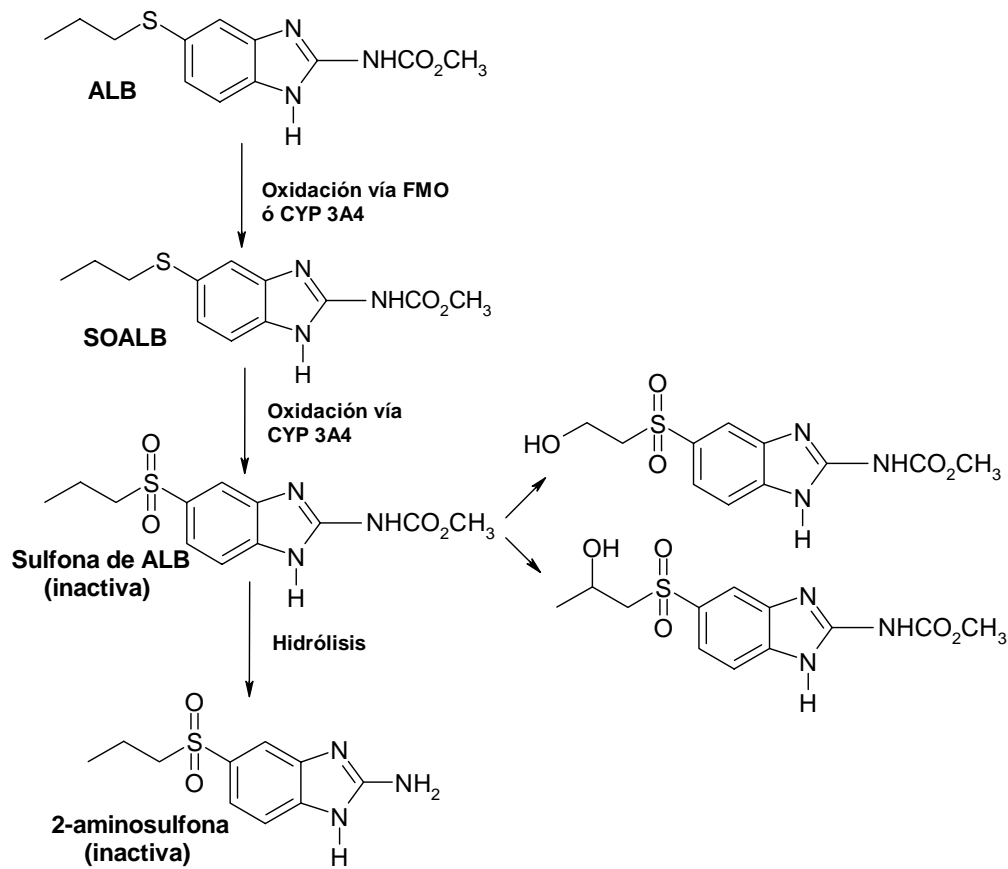
El ALB se absorbe a lo largo del tracto gastrointestinal, siendo el intestino delgado el sitio de mayor absorción. En general la absorción de este fármaco es pobre (<1 % de la cantidad administrada) debido a su baja solubilidad acuosa (Jung y col, 1998).

Después de su absorción intestinal, el fármaco se metaboliza rápidamente en el hígado, y probablemente también por enzimas intestinales (CYP 3 A4), a sulfóxido de albendazol (SOALB) el principal metabolito activo del fármaco. Estudios de unión a proteínas demostraron que el albendazol se une de 89 a 92% a proteínas plasmáticas, mientras que el sulfóxido de 62 a 67% (Jung y col, 1998), ésto limita la cantidad de fármaco libre en circulación. El sulfóxido se distribuye a todo el cuerpo y cruza la barrera hematoencefálica, por lo que se detecta un alto porcentaje en líquido



cefalorraquídeo (43% de lo encontrado en plasma). Estos niveles, al igual que los de plasma presentaron una gran variabilidad interindividual, misma que no está relacionada con la edad ni el sexo (Jung y col, 1990).

Estudios microsomales en un gran número de especies indican que existen dos sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo del ALB como las flavinas monooxigenasas y el citocromo P450 (CYP P450). Estudios en microsomas humanos muestran que la producción de SOALB está mediada tanto por la flavin monooxigenasa como por el citocromo, y es el CYP 3A4 el principal sistema enzimático que metaboliza a éste fármaco, mientras que la formación de la sulfona es principalmente catalizada por el CYP 1A (Gottschall y col, 1990; Rawden y col, 2000). La figura 5 muestra los pasos involucrados en la formación de sulfóxido y de la sulfona de ALB.



**Figura 5.** Principales vías metabólicas de albendazol (ALB). SOALB: Sulfóxido de albendazol, FMO: Flavin monooxigenasa, CYP 3A4: citocromo 3A4.

Los metabolitos del ALB se eliminan principalmente por excreción renal. La concentración de metabolitos (sulfóxido y sulfona) en el hígado es baja, careciendo de importancia esta vía de eliminación. El aclaramiento renal del metabolito en voluntarios varía entre 158 y 809 mL/h, después de un periodo de 8 h, mientras que la excreción urinaria acumulada en 24 h es de 0.09-0.88% de la dosis total (Marriner y col, 1986). La vida media de eliminación de este metabolito en pacientes con neurocisticercosis varía entre 10 y 15 h (Jung y col, 1992) y en voluntarios sanos es de  $8.8 \pm 4.2$  h (Nagy y col, 2002).

La dosis propuesta en humanos para el tratamiento de infecciones por nemátodos es de 400 mg/día y los efectos adversos mas frecuentes son el daño epigástrico, diarrea, náuseas, vómito, dolor de cabeza, mareos y rara vez alergia. A altas dosis y uso prolongado del fármaco, como en el caso del tratamiento de la NCC (400 mg dos veces al día durante 8 días), se pueden presentar anomalías en la función hepática, leucopenia y alopecia (De Silva y col, 1997), por lo que se recomienda monitorear la función hepática y la cuenta de leucocitos durante los ciclos del tratamiento (Smith y col, 1997; Takayanagui, 2004).

El ALB se considera un compuesto teratogénico ya que causa embriotoxicidad y malformaciones esqueléticas en ratas y conejos. La respuesta teratogénica en rata se reporta a dosis de 10 y 30 mg/Kg/día, durante los días del 6 al 15 de gestación y en coneja preñada administrada con una dosis de 30 mg/Kg/día, durante los días del 7 al 19 de gestación. La dosis letal media de este fármaco en rata es de 2.4 g/Kg (McKellar y Scott, 1990; Theodorides y col, 1993).

Tanto el ALB como su metabolito activo tienen efectos embriotóxicos, pero considerando que las concentraciones plasmáticas del fármaco son indetectables, la embriotoxicidad se atribuye a su metabolito activo. La Food and Drug Administration

(FDA) cataloga a éste fármaco como clase “C”, ya que estudios en animales han revelado efectos adversos en el feto, que pueden ser muerte del embrión, teratogénicos, u otros, pero no hay estudios controlados en mujeres. Debido a ésto, el uso de este fármaco en el primer trimestre del embarazo debe ser vigilado y sólo si se justifica el beneficio potencial, considerando el riesgo probable para el feto (de Silva y col, 1997; FDA, 2007).

#### **2.4.3. Estudios de formulaciones con albendazol**

En las últimas décadas se han abordado diferentes estrategias orientadas a incrementar la solubilidad y biodisponibilidad del ALB. Redondo y col. (1998), evaluaron la influencia de dos surfactantes, el polisorbato 80 y el taurocolato de sodio, sobre la biodisponibilidad de éste fármaco en ratas. El fármaco se disolvió previamente con dimetilsulfóxido y la concentración final de surfactantes en la formulación fue de 5 o 10 mM con taurocolato de sodio y de 0.0022% o 0.22% con polisorbato 80. Los resultados mostraron que el área bajo la curva (AUC) del perfil plasmático de SOALB se incrementó 55% con taurocolato de sodio (5 mM) y 88% con polisorbato 80 (0.0022%), en comparación con una solución del fármaco en dimetilsulfoxido (1%), por lo que la biodisponibilidad de este fármaco puede ser incrementada por la adición de surfactantes. Por otra parte, Gaur y col. (2007) desarrollaron diferentes formulaciones de ALB, todas ellas contenían al menos 2 de los siguientes ingredientes: polietilenglicol 400 ó 6000, hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, ácido cítrico, ácido esteárico, lauril sulfato de sodio y aceite de cacahuete. La efectividad de estas formulaciones se probó contra filariasis experimental en ratones. Los resultados mostraron que la actividad de la formulación conteniendo metilcelulosa (0.06 g/12 mL),

laurilsulfato de sodio (0.06 g/12 ml) y aceite de cacahuete (6 g/12 mL) fue superior (43%) a la obtenida con una suspensión comercial de ALB (9%).

Otra propuesta fue el desarrollo de una formulación líquida (Torrado y col, 1997), en la cual el fármaco se disolvió en un sistema de Transcutol al 40% peso/peso en solución amortiguadora de KCl/HCl pH 1.2. Los resultados mostraron que la actividad antihelmíntica de albendazol en ratones infectados con *Trichinella spiralis* se incrementó significativamente con la solución (95.5 %), en comparación con la suspensión acuosa del fármaco en carboximetilcelulosa (2.38%). Asimismo, los niveles plasmáticos del metabolito activo se incrementaron, encontrándose que los valores de concentración plasmática máxima (Cmax) fueron de 45.27 µg/mL y 12.8 µg/mL para la solución y la suspensión de ALB, respectivamente. Sin embargo, la estabilidad del fármaco en este sistema no se documentó.

Por otro lado, Daniel-Mwambete y col. (2004) reportaron un incremento en la solubilidad de ALB, al preparar un complejo fármaco-polivinilpirrolidona K12 (1:10) en medio ácido (255.2 µg/mL), en comparación con el fármaco puro (183.7 µg/mL). Este incremento en la solubilidad se reflejó en un incremento en la biodisponibilidad del fármaco. Los valores de AUC y Cmax del metabolito activo con este complejo fueron de 0.8 µg h/mL y 0.7 µg/mL, respectivamente, y estos valores fueron significativamente mayores comparados con los valores obtenidos con una suspensión del fármaco en carboximetilcelulosa con la que se obtuvieron valores de AUC y Cmax de 0.5 µgh/mL y 0.3 µg/mL, respectivamente. Por lo que para este fármaco se observó que un aumento en la solubilidad en medio ácido correlaciona con un incremento en su biodisponibilidad.

En otro estudio, Kalaiselvan y col. (2006a) estudiaron el mecanismo de liberación *in vitro* de ALB de dispersiones sólidas preparadas con poloxámero 407 ó polietilenglicol

como acarreadores. Los resultados mostraron que la disolución del fármaco fue mayor (16.1 veces) con el poloxámero en una proporción 1:5 y de 9.1 veces con una la dispersión preparada con polietilenglicol, en comparación con el fármaco puro. Los estudios de mostraron que los polímeros se asociaron intermolecularmente con el fármaco permitiendo la inhibición de la re-cristalización del este ultimo.

Asimismo, Mingjie y col. (2002) reportaron un incremento en la biodisponibilidad sistémica de ALB en pacientes con Echinococcosis (12.5 mg/Kg), con la administración de una emulsión en aceite de soya-agua (30%) en comparación con las tabletas comerciales. Los resultados mostraron que los valores de Cmax para las tabletas y para la emulsión fueron de  $1.06 \pm 0.38$  mg/L y de  $1.71 \pm 0.47$  mg/L, mientras que los valores de AUC fueron de  $13.24 \pm 4.93$  y  $21.01 \pm 7.54$ , respectivamente. La eficacia clínica de esta formulación se evaluó posteriormente en el tratamiento de pacientes con Echinococcosis hepática, observándose un 97.2% de eficacia con un tratamiento de 6 meses con una dosis de ALB de 10 mg/Kg. Sin embargo, también se observó un incremento en las aminotransferasas en un 49% de los pacientes después de 3 meses de administración, que disminuyeron al suspender el tratamiento (Chai y col, 2004).

Más recientemente, Ceballos y col. (2008) evaluaron la biodisponibilidad y la eficacia antihelmíntica de una solución acuosa de éste fármaco (50  $\mu$ g/mL, pH 1.2) en ratones infectados con *Echinococcus granulosus* usando una dosis de 0.5 mg/Kg en un intervalo de 12 h durante 15 días. Los resultados mostraron un incremento significativo en el valor de AUC (1.2  $\mu$ g h/mL) en comparación con el obtenido con una suspensión acuosa de fármaco en carboximetilcelulosa (0.33  $\mu$ g h/mL), mientras que el valor de Cmax obtenido con la solución y con la suspensión fue muy similar, 0.37  $\mu$ g/mL y 0.34  $\mu$ g/mL, respectivamente. La reducción de la carga parasitaria fue del 91% y 85% con la

solución y la suspensión, respectivamente, por lo que ambas formulaciones fueron igualmente efectivas.

Muchos de los excipientes usados en las formulaciones mencionadas anteriormente, pueden tener efecto como mejoradores de la absorción de ALB, lo cual puede ser útil para incrementar la biodisponibilidad oral del fármaco. Desafortunadamente, muchos de estos agentes también pueden ser irritantes para el sistema digestivo, afectando las membranas biológicas, por lo que su uso debe ser restringido.

Ante la necesidad de obtener formulaciones más seguras, en los últimos años se ha propuesto el uso de las ciclodextrinas como una estrategia para mejorar la solubilidad de muchos fármacos poco solubles. Estas moléculas son excipientes útiles para mejorar la biodisponibilidad y estabilidad de muchos fármacos, son seguras y no ha mostrado causar efectos adversos serios después de su administración. Estas moléculas se describen más detalladamente en la sección 2.5. A continuación se hace una breve revisión de los estudios realizados con ciclodextrinas y ALB.

#### **2.4.4. Estudios de formulaciones con ciclodextrinas y albendazol**

Castillo y col. (1999) evaluaron la influencia de tres ciclodextrinas: la  $\beta$ -ciclodextrina, la metil- $\beta$ -ciclodextrina y la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, sobre la solubilidad y biodisponibilidad de ALB. La solubilidad del fármaco en agua destilada se incrementó al utilizar la metil- $\beta$ -ciclodextrina en una concentración de 40 mM a 160 mM, mientras que en una solución amortiguadora de ClK/ClH 0.2M, la mayor solubilidad del fármaco se observó con la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (1:1). Ésta fue elegida por los autores para preparar el complejo de inclusión sólido, debido a su baja toxicidad y alto efecto en la solubilización del fármaco. Los resultados de farmacocinética en ratones usando una dosis de 20 mg/Kg muestran que la biodisponibilidad de ALB usando el complejo

fármaco-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina fue mayor que la obtenida con una suspensión convencional del fármaco en carboximetilcelulosa. En este estudio los valores de  $C_{max}$  y AUC fueron mayores con el complejo en comparación con los obtenidos con una suspensión del fármaco en carboximetilcelulosa (7.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 26.17  $\mu\text{g h}/\text{mL}$  contra 4.51  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 18,7  $\mu\text{g h}/\text{mL}$ ). Asimismo, García-Rodríguez y col. (2001) evaluaron la biodisponibilidad y eficacia de este mismo complejo en ratones infectados con *Trichinella spiralis*. Los autores reportan que la biodisponibilidad de ALB se incrementó significativamente después de la administración del complejo fármaco-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (1:1), en comparación con una suspensión convencional de éste en carboximetilcelulosa. La  $C_{max}$  se incrementó de 7.53  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 16.96  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y el AUC de 34.296  $\mu\text{g h}/\text{mL}$  a 78.185  $\mu\text{g h}/\text{mL}$ , después de la administración de la suspensión y el complejo con ciclodextrina respectivamente. Además, se observó un incremento de la eficacia antihelmíntica del fármaco cuando se usó el complejo, particularmente en la forma adulta del parásito (78%) (dosis de 5 mg/Kg) y la quística (82%) (dosis de 100 mg/Kg), en comparación con la suspensión convencional (en la forma adulta 18% y en la forma enquistada 38%).

Evrard y col. (2002), por su parte, evaluaron una formulación preparada por la disolución de 1.5 mg de ALB/mL en una solución conteniendo hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina 200 mM y ácido cítrico 50 mM. Los resultados mostraron un efecto sinérgico entre la ciclodextrina y el ácido cítrico, ya que esta combinación logró un incremento importante en la solubilidad del fármaco en agua (de 0.2 a 1.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). También observaron un incremento significativo en la biodisponibilidad relativa del fármaco en borregos después de la administración de la solución con ciclodextrina y ácido cítrico, ya que el valor de AUC de la solución fue 37% más alto que el obtenido

con una suspensión comercial. Asimismo, la  $C_{max}$  fue dos veces mayor y el valor de  $T_{max}$  se redujo de 9.7 a 2.3 h.

García y col. (2003) evaluaron la biodisponibilidad de una formulación de ALB preparada como una solución con 20% peso/volumen de hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina en 0.2 M de HCl (pH 0.92), en ratones administrados con una dosis de 100 mg/Kg. Los resultados mostraron que los valores de AUC y  $C_{max}$  fueron significativamente mayores (100.2  $\mu\text{g h/mL}$  y 14.4  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) en comparación con aquellos obtenidos con una suspensión convencional en carboximetilcelulosa (42.4  $\mu\text{g h/mL}$  y 5.1  $\mu\text{g/mL}$ ). La eficacia antihelmíntica de esta solución (dosis 100 mg/Kg) se evaluó en el modelo de *Trichinellosis murina* y no se observó diferencia en eficacia sobre el estado larvario de *Trichinella spiralis* cuando se utilizó la solución o la suspensión convencional (eficacia de 55.8% y 51.9%, respectivamente). En contraste, sí se observó un incremento en la eficacia sobre larvas enquistadas en el músculo de los ratones (eficacia de 97.5% y 33% con la solución y la suspensión, respectivamente).

Casulli y col. (2006) evaluaron también la biodisponibilidad y efectividad del mismo complejo de ALB con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (1:1) contra larvas de *Trichinella spiralis*, pero usando la dosis recomendada para humanos (15 mg/Kg). Los autores reportan que el valor de  $C_{max}$  fue similar en los ratones tratados con el fármaco solo y en los tratados con el complejo. En contraste, cuando se compararon los dos tratamientos en términos de AUC, se encontró una diferencia significativa ( $p < 0.001$ ), pues en el caso del fármaco sólo se obtuvo un valor de 2 441  $\mu\text{g h/mL}$ , mientras que con el complejo fue de 8 384  $\mu\text{g h/mL}$ .

Por otra parte, Rigter y col. (2004) evaluaron la biodisponibilidad de tres diferentes formulaciones de ALB en voluntarios sanos. Las formulaciones consistieron en una suspensión con aceite de cacahuete y polisorbato 80, una solución con hidroxipropil- $\beta$ -



ciclodextrina (3 mg de fármaco/mL en una solución de ciclodextrina al 40 % (peso/volumen), 50 mM de ácido cítrico y 0.15 % de metil-parahidroxibenzoato) y supositorios con polietilenglicol 4000 (3:1), usando como producto de comparación tabletas comerciales (Zentel). Los resultados mostraron que la biodisponibilidad se incrementó 4.3 y 9.7 veces con la suspensión con aceite de cacahuete y con la formulación con ciclodextrina, respectivamente. Desafortunadamente, esta última formulación no fue bien tolerada por los voluntarios ya que siete de diez individuos presentaron diarrea. En el caso de los supositorios no se detectaron concentraciones plasmáticas del fármaco ó de su metabolito activo, después de su administración, indicando su insignificante absorción por esta vía de administración.

Recientemente se han evaluado sistemas multicomponentes como una estrategia para aumentar la eficacia de las ciclodextrinas como agentes solubilizantes de este fármaco. Kaliselvan y col. (2006b) obtuvieron un incremento en la solubilidad del fármaco mediante la preparación de complejos ternarios con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y ácidos carboxílicos (1:1:1), tales como: ácido fumárico, ácido cítrico y ácido tartárico. Los mejores resultados se observaron con los complejos de fármaco-ciclodextrina-ácido cítrico y fármaco-ciclodextrina-ácido tartárico preparados por el método de amasado, ya que lograron incrementar la disolución de fármaco puro de 8.9% a 78.6% y 90.9%, respectivamente. Asimismo, los autores evaluaron diferentes métodos de preparación de estos complejos ternarios, reportando que la biodisponibilidad de ALB en conejos se incrementó 3 veces después de la administración del complejo fármaco-ciclodextrina-ácido tartárico, preparado por el método de co-evaporación, en comparación con el complejo preparado como mezcla física y con el sistema binario sin hidroxíácido. Esta misma formulación mejoró la eficacia antihelmíntica del fármaco (90%) contra la fase

sistémica de *Trichinella spiralis* (larvas migrantes), en comparación con una dispersión sólida del fármaco con polivinilpirrolidona (1:1) (60%) (Kalaiselvan y col, 2007).

A pesar de todos estos estudios, no hay reportes del uso de algunas de estas formulaciones en humanos o de alguna nueva formulación que sea más eficaz en el mercado. Por lo que este proyecto se enfocó a evaluar dos nuevas formulaciones ternarias de ALB conteniendo  $\beta$ -ciclodextrina y un polímero hidrosoluble.

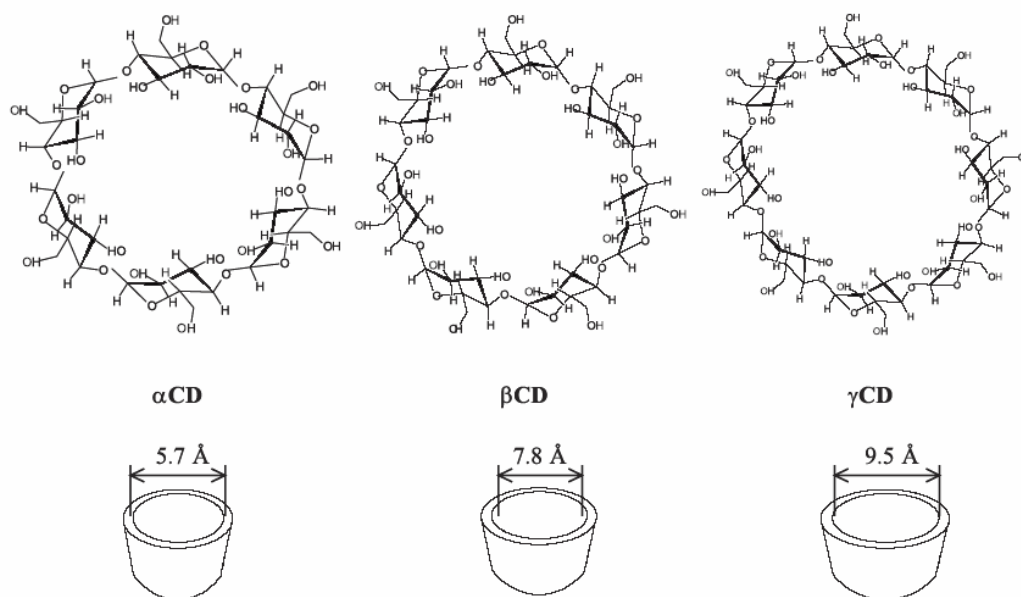
La  $\beta$ -ciclodextrina fue considerada como la más idónea para utilizarla en el sistema ternario, a pesar de su baja capacidad para incrementar la solubilidad de éste fármaco, debido a que su costo es mucho menor comparado con el costo de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Es muy importante considerar el costo final de la formulación, ya que se debe tener en mente su aplicación en regiones pobres donde la mejora en la eficacia de éste fármaco es necesaria. Además, recientemente en un estudio realizado por Moriwaki y col (2008) se resaltó la utilidad de la  $\beta$ -ciclodextrina en combinación con ácido acético (1:1) para incrementar significativamente la solubilidad de este fármaco. A continuación se hace una breve revisión de las ciclodextrinas así como de los polímeros hidrosolubles considerados en este proyecto.

## **2.5. Ciclodextrinas**

Las ciclodextrinas forman un grupo de oligosacáridos estructuralmente relacionados que contienen varias unidades de glucosa unidas por medio de enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1-4) conformando un anillo, el cual se genera por la ciclación del almidón, que lleva a cabo un grupo de amilasas llamadas glucotransferasas (Szejtli, 1998).

Entre las ciclodextrinas más comunes se encuentran la  $\alpha$ -ciclodextrina, formada por seis unidades de D-glucosa; la  $\beta$ -ciclodextrina, que consta de siete unidades de glucosa y la  $\gamma$ -ciclodextrina, constituida por ocho unidades de glucosa. Estas tres ciclodextrinas son

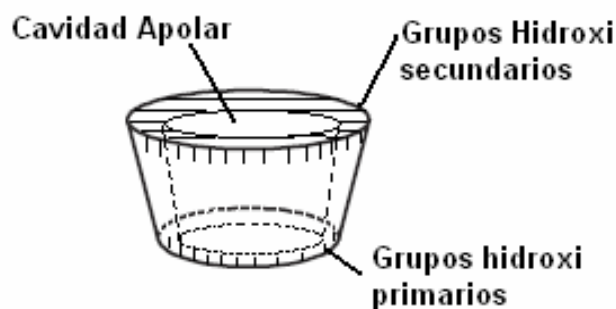
sustancias cristalinas, no higroscópicas y homogéneas, en las que las unidades de glucosa se unen para dar lugar a un macro-ciclo con aspecto de cono truncado o toroide, dejando una cavidad interna que les confiere características singulares, entre ellas la capacidad de formar complejos de inclusión. Las moléculas de ciclodextrina tienen un extremo que contiene grupos hidroxilo primarios, en el otro extremo grupos hidroxilo secundarios y en el interior de la cavidad los grupos CH y oxígenos glicosídicos. Los extremos de la ciclodextrina que contienen los grupos hidroxilos son muy polares, mientras que su interior es relativamente no polar. Las estructuras de estos compuestos se presentan en la figura 6.



**Figura 6.** Estructura de las tres ciclodextrinas más comunes.  $\alpha$ -ciclodextrina ( $\alpha$ CD),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ CD) y  $\gamma$ -ciclodextrina ( $\gamma$ CD).

Debido a la existencia de las uniones  $\alpha$  (1-4) entre las unidades de glucosa, todos los grupos hidroxilo secundarios quedan orientados hacia uno de los bordes de la cavidad, mientras que todos los grupos hidroxilo primarios se sitúan en el borde opuesto. El

borde correspondiente a los hidroxilos primarios es más estrecho, debido a que la libre rotación de los grupos hidroxilo primarios reduce el diámetro efectivo de la cavidad. Esta disposición confiere el aspecto característico de cono truncado a las distintas ciclodextrinas, de tal forma que la cavidad está delimitada por los átomos de hidrógeno y de oxígeno que forman parte de las uniones glicosídicas (Szejtli y col, 1987) (Figura 7).



**Figura 7.** Esquema del cono truncado correspondiente a una ciclodextrina.

Los grupos hidroxilo secundarios de los carbonos C-2 de las unidades de glucosa forman puentes de hidrógeno con los hidroxilo secundarios de los carbonos C-3 de las unidades de glucosa adyacentes, dando lugar a la aparición de un cinturón en el borde de los hidroxilo secundarios. En la única ciclodextrina en la que la formación de los puentes de hidrógeno entre las unidades de glucosa es completa es en el caso de la  $\beta$ -ciclodextrina, lo que confiere a esta una estructura más rígida y además explica su menor solubilidad en agua con respecto a las otras ciclodextrinas (Loftsson y Brewster, 1996). En la tabla 1 se muestran algunas propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas más comunes.

**Tabla 1.** Propiedades fisicoquímicas de las ciclodextrinas más comunes.

	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
<b>No. de unidades de Glucosa</b>	6	7	8
<b>Peso Molecular</b>	972	1135	1297
<b>Diámetro de la cavidad central (Å)</b>	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
<b>Solubilidad en agua a 25 °C ( g/100 mL)</b>	14.5	1.85	23.2

Referencia: Loftsson y Brewster, 1996

### 2.5.1. Absorción, metabolismo y eliminación

Después de la administración oral de las ciclodextrinas se absorben cantidades insignificantes de forma inalterada a través del tracto gastrointestinal. Aproximadamente el 2% de  $\alpha$ -ciclodextrina y del 1-10 % de la  $\beta$ -ciclodextrina se absorben en el intestino por transporte pasivo (Frijlink y col, 1990). La mayor parte de la  $\alpha$ -ciclodextrina y la  $\beta$ -ciclodextrina administrada por vía oral se metabolizan en el intestino grueso por la microflora del colon, siendo la glucosa y la maltosa los principales metabolitos, los cuales se absorben por la misma vía que el almidón. No toda la  $\beta$ -ciclodextrina es digerida, parte de ella se excreta en las heces (Shizuka y col, 1996; Shimpi y col, 2005).

### 2.5.2. Toxicidad

La administración oral de las ciclodextrinas naturales no da lugar a problemas de toxicidad aguda o crónica ni a cambios significativos en los órganos o en los valores sanguíneos biológicos normales. La dosis letal media oral ha sido difícil de determinar, ya que altas dosis no causan la muerte; en ratas es mayor a 12.5, 18.8, y 8 g/Kg para  $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina y  $\gamma$ -ciclodextrina, respectivamente (Szejtli, 1987 y 1988).

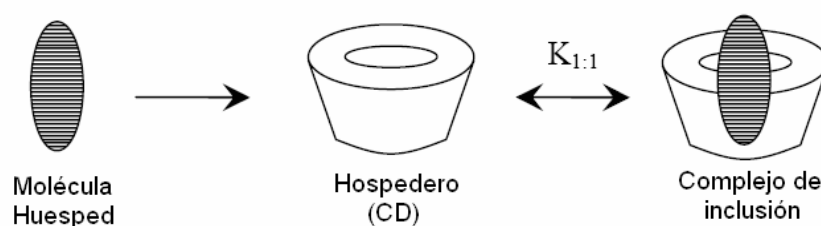
La administración intramuscular de altas concentraciones de  $\beta$ -ciclodextrina da lugar a ulceraciones y la intravenosa produce nefrotoxicidad y efectos hemolíticos, probablemente debido a su alta solubilidad y rápida degradación enzimática. La dosis letal intravenosa para  $\alpha$ -ciclodextrina y  $\beta$ -ciclodextrina es de 1008 mg/Kg y 788 mg/Kg, respectivamente. Resultados similares se han obtenido con la administración subcutánea, intraperitoneal e intramuscular (Frank y col, 1976; Gerlóczy y col 1985; Yamamoto y col, 1990).

### **2.5.3. Derivados de ciclodextrinas**

Las ciclodextrinas naturales, particularmente la  $\beta$ -ciclodextrina, tienen solubilidad acuosa limitada. Esta baja solubilidad se atribuye a la formación estable de un “cinturón” de hidrógenos secundarios y a su habilidad de formar un “enrejado” estable alrededor de la molécula, lo cual limita su interacción con el agua. Sin embargo, debido a que posee un diámetro de cavidad de 6 Å, adecuada para albergar en su interior numerosos tipos de fármacos, incluso aquellos que poseen en su estructura grupos aromáticos, se han hecho diversas modificaciones con el fin de aumentar su solubilidad. Dichas modificaciones dan origen a los distintos tipos de  $\beta$ -ciclodextrinas tales como las alquiladas, metiladas, hidroxipropiladas e hidroxietiladas, carboximetiladas, con radicales sulfoalquiladas (sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina), etc. Todas estas modificaciones causan cambios radicales en las propiedades fisicoquímicas de la ciclodextrina inicial, especialmente incrementándose su solubilidad (Szejtli, 1998; Carrier y col, 2007). Estas ciclodextrinas tienen un gran número de aplicaciones. Ambos hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y sulfobutiléter- $\beta$ -ciclodextrina mejoran sustancialmente la biodisponibilidad oral de cinarizina, glibenclamida, tacrolimus, tolbutamina, entre otros fármacos (Carrier y col, 2007).

### 2.5.4. Formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas

Una de las características de las ciclodextrinas es su capacidad para asociarse con moléculas (huéspedes), estableciendo un equilibrio asociación-disociación que se denomina complejo de inclusión. Esta entidad está formada por dos o más moléculas en las que una de ellas actúa como *hospedera*, incluyendo total o parcialmente a la o a las moléculas huéspedes, y sin que en ningún caso se establezcan uniones covalentes (Figura 8)



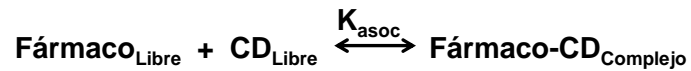
**Figura 8.** Representación esquemática de la formación de un complejo de inclusión de un fármaco con una ciclodextrina (CD). K es la constante de asociación entre el fármaco y la ciclodextrina en una proporción 1:1.

Se ha reportado que la inclusión en las cavidades de ciclodextrinas obedece principalmente a la sustitución de las moléculas de agua alojadas en el interior de la cavidad por las moléculas huéspedes de naturaleza menos polar. Szejtli (1998) sugiere que las moléculas de agua en el interior de la cavidad poseen una entalpía elevada, por ello la formación del complejo supone el desplazamiento de las moléculas de agua por las moléculas huésped y en consecuencia este proceso implica un cambio favorable en la entalpía.

Para que se forme un complejo de inclusión deben confluír una serie de características geométricas, químicas y estéricas entre la molécula a incluir y la ciclodextrina. Las interacciones huésped-ciclodextrina son estabilizadas por puentes de hidrógeno, interacciones de van der Waals y uniones hidrofóbicas (van Helden, 1992; Ross y Rekharshy, 1996).

La complejación de fármaco con ciclodextrina es un proceso dinámico y usualmente se describe con la ecuación (1) y puede ser definida por una constante de asociación ( $K_{asoc}$ ), donde se encuentran en equilibrio el fármaco libre ( $Fármaco_{Libre}$ ) y la ciclodextrina ( $CD_{Libre}$ ), con el complejo fármaco-ciclodextrina ( $Fármaco-CD_{Complejo}$ ).

Ecuación (1)



### 2.5.5. Efecto de las ciclodextrinas en la solubilidad y biodisponibilidad de los fármacos

Las ciclodextrinas pueden solubilizar fármacos en soluciones acuosas a través de la formación de complejos de inclusión, debido a que los grupos hidroxilos del exterior de las ciclodextrinas son relativamente hidrofílicos, mientras que su interior es lipofílico (semipolar) (Stella y Rajewski, 1997; Carrier y col., 2007). Los fármacos hidrofóbicos tienen una gran afinidad por la cavidad lipofílica en solución acuosa, la cual proporciona un microambiente heterogéneo e hidrofóbico, de esta manera la inclusión de los fármacos en éstas cavidades incrementa su solubilidad y su biodisponibilidad. También se incrementa la velocidad de disolución como consecuencia de que los principios activos se dispersan y posteriormente se solubilizan con facilidad en los fluidos gastrointestinales. Se ha demostrado que la solubilización eficaz del principio activo depende del tipo de ciclodextrina empleada. Así, en estudios realizados sobre los complejos de inclusión de digitoxina, con  $\beta$ -ciclodextrina, 2-hidroxiethyl- $\beta$ -ciclodextrina y 2-hidroxi-propil- $\beta$ -ciclodextrina, la solubilidad máxima del fármaco se obtuvo con la



2-hidroxietyl- $\beta$ -ciclodextrina (Yoshida y col, 1988). En la tabla 2 se enumeran algunos ejemplos de fármacos que mejoran su biodisponibilidad, como consecuencia de la formación de complejos de inclusión con una ciclodextrina.

Es importante destacar que dependiendo del fármaco y del tipo de ciclodextrina empleada para formar el complejo de inclusión, el comportamiento sobre la biodisponibilidad puede ser diferente (Loftsson y Brewster, 1996).

**Tabla 2.** Complejos de inclusión con diferentes tipos de ciclodextrina donde la biodisponibilidad se incrementa notablemente.

Fármaco	Ciclodextrina	Año de Reporte
Tacrolimus	DM- $\beta$ CD	2001
Itraconazol	$\beta$ CD	2001
Artemisina	$\beta$ CD y $\gamma$ CD	2001
Albendazol	HP- $\beta$ CD	2002
Aciclovir	$\beta$ CD	2002
Flutamida	HP- $\beta$ CD	2002
Nifedipino	$\beta$ CD	2002
Etomidato	SBE- $\beta$ CD	2004
Tamoxifen	HP- $\beta$ CD	2006

$\beta$ CD es  $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ CD es  $\gamma$ -ciclodextrina, DM- $\beta$ CD es dimetil- $\beta$ -ciclodextrina, HP- $\beta$ CD es hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina y SBE- $\beta$ CD es sulfobutil-éter- $\beta$ -ciclodextrina. Referencia: Stella y He, 2008.

### 2.5.6. Ciclodextrinas y polímeros hidrosolubles

Frecuentemente es posible facilitar la solubilización de fármacos ionizables a través de la complejación con ciclodextrinas y un ajuste de pH o por la adición de polímeros hidrosolubles y/o hidroxiaácidos a las soluciones con ciclodextrinas (Loftsson y

Friðriksdóttir, 1998). En incremento en la solubilidad de fármacos hidrofóbicos es resultado de un aumento de la constante de formación del complejo fármaco-ciclodextrina, debido a que los polímeros son capaces también de aumentar la solubilidad acuosa de las ciclodextrinas sin disminuir sus propiedades complejantes, haciéndolas más factibles como excipientes farmacéuticos, aunque a la fecha no se conoce el mecanismo de interacción molecular (Loftsson y col, 1994).

Como se mencionó anteriormente, entre las ciclodextrinas naturales, la  $\beta$ -ciclodextrina tiene una solubilidad limitada en agua y los complejos con fármacos hidrofóbicos, algunas veces no logran incrementar la solubilidad del fármaco. En 1994, Hladon y Cwiertinia mostraron que la  $\beta$ -ciclodextrina interactúa con un gran número de derivados de la celulosa solubles en agua. También se sabe que una pequeña concentración de polímero incrementa la habilidad complejante de las ciclodextrinas mejorando la disponibilidad de los fármacos en soluciones acuosas (Loftsson y col, 1994; Ganzerli y col, 1996). Dentro de los polímeros usados para este fin se encuentran el polietilenglicol, la hidroxipropilmetilcelulosa, la polivinilpirrolidona y la carboximetilcelulosa.

A la fecha existen pocos reportes del uso de la  $\beta$ -ciclodextrina en combinación con polímeros hidrosolubles los cuales usados en pequeñas proporciones (< 10%), se han reportado como excelentes candidatos para mejorar la capacidad solubilizante de esta ciclodextrina. Ammar y col. (2006) reportan que la velocidad de disolución de glimepirida de un sistema ternario de fármaco- $\beta$ -ciclodextrina-polivinilpirrolidona es dependiente del tipo y de la concentración de polímero. Los resultados de sus investigaciones muestran que el empleo de un 5% de polivinilpirrolidona incrementa la disolución del fármaco (45%) en comparación con al fármaco puro (12%). En la sección 2.6 se describe ampliamente los polímeros hidrosolubles utilizados en este estudio.

### 2.5.7. Usos de las ciclodextrinas

Desde 1970 se ha incrementado el número de patentes relativas a la formulación de medicamentos con ciclodextrinas (Uekama y col, 1994; Albers y Muller, 1995; Thompson, 1997). Las razones se listan a continuación:

- a) Las ciclodextrinas naturales se pueden obtener en grandes cantidades y su producción es relativamente económica.
- b) En general, son mucho menos dañinas, desde el punto de vista toxicológico, que otros compuestos que se utilizan como excipientes.
- c) Son consideradas como excipientes para una formulación farmacéutica dada la seguridad de su administración, por ello, las distintas farmacopeas (Estados Unidos, Europea y Japonesa) incluyen monografías relativas a la  $\beta$ -ciclodextrina, con los requerimientos que ésta debe satisfacer.

Uno de los avances dentro de la industria química ha sido el empleo de ciclodextrinas como agentes encapsulantes para transportar todo tipo de ingredientes como saborizantes, vitaminas y cosméticos, entre muchas otras aplicaciones, ya que estas pueden formar mezclas o complejos de gran estabilidad química con mayor solubilidad en agua.

Las ciclodextrinas tienen la habilidad de alterar las propiedades físicas, químicas y biológicas de la molécula huésped a través de la formación del complejo de inclusión.

Las ciclodextrinas son utilizadas habitualmente para aumentar:

- La solubilidad de fármacos poco solubles
- La biodisponibilidad
- La estabilidad física y química

En la tabla 3 se muestran varios de los usos actuales de las ciclodextrinas en la industria farmacéutica. En México se comercializan dos formulaciones que contienen  $\beta$ -ciclodextrina: meloxicam/ $\beta$ -ciclodextrina y benzotiofeno/  $\beta$ -ciclodextrina (Stella y He, 2008).

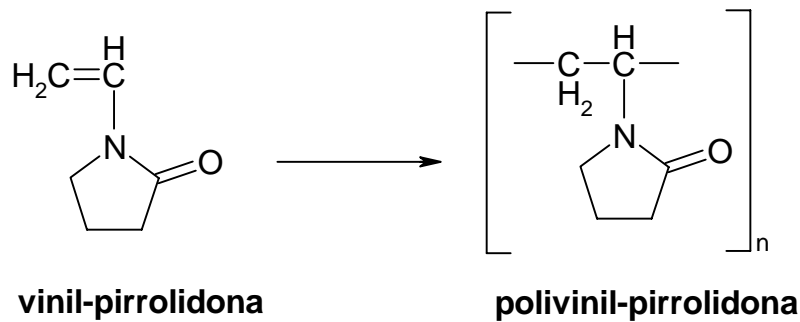
**Tabla 3.** Formulaciones farmacéuticas donde se emplean ciclodextrinas.

<b>Fármaco/ciclodextrina (nombre comercial)</b>	<b>Indicación</b>	<b>Formulación (País de comercialización)</b>
PGE <sub>2</sub> / $\beta$ CD (Prostarmon E)	Inducción de labor de parto	Tableta sublingual (Japón)
PGE <sub>1</sub> / $\alpha$ CD (Prostavasin)	Arteriosclerosis crónica	Inyección intraarterial (Japón)
Proxicam/ $\beta$ CD (Cicladol)	Analgésico, antiinflamatorio	Tableta y supositorio (Italia)
Aceite de ajo/ $\beta$ CD (Tegra)	Antiarterioesclerótico	Cápsulas (Alemania)
Benexato/ $\beta$ CD (Lonmiel)	Antiulcerante	Cápsulas (Japón)
Nitroglicerina/ $\beta$ CD (Nitropen)	Dilatador coronario	Tableta sublingual (Japón)
Cefalosporina/ $\beta$ CD (Meiact)	Antibiótico	Tableta (Japón)
Nimesulid/ $\beta$ CD (Mesulid Fast)	Antiinflamatorio no esteroideo	Tableta (Italia)
Nicotina/ $\beta$ CD (Nicorette)	Dependencia a la nicotina	Tableta sublingual (Japón)
Dextrometorfano/ $\beta$ CD (Rynathisol)	Antitusígeno	Tableta (Italia)
Omeprazol/ $\beta$ CD (Omebeta)	Bombeo de protones	Tableta (Alemania)
Cetirizina/ $\beta$ CD (Cetirizin)	Antialérgico	Colirio (Alemania)

$\beta$ CD es  $\beta$ -ciclodextrina. Referencia: Rajeswari y col, 2005.

## 2.6. Polivinilpirrolidona

La polivinilpirrolidona (PVP) es un polímero de la N-vinilpirrolidona con un peso molecular de entre 10,000 a 700, 000. Se le conoce también como plasdona, povidona, povidonum, poli(1-vinil-2-pirrolidona) (Figura 9). Es un polvo blanco cremoso, higroscópico. A concentraciones del 10% forma soluciones viscosas, de reacción neutra ó ligeramente ácida. Es fácilmente soluble en agua a 60°C, soluble en cloroformo, ciclohexanol, etanol, isopropanol, metanol, propanol, butanol, polietilenglicol y trietanolamina. Éste polímero es insoluble en ciclohexano, dietiléter, acetato de etilo, pentano, tetracloruro de carbono tolueno y xileno.



**Figura 9.** Estructura de vinil-pirrolidona y polivinilpirrolidona.

Generalmente en los polímeros, el peso molecular promedio se expresa en diferentes formas: peso, número y viscosidad promedio. El peso molecular de éste polímero se expresa con el valor de K, el cual indica su la viscosidad promedio y está directamente relacionado con el peso molecular promedio del polímero.

En la tabla 4 se muestran los valores de peso molecular promedio de los diferentes grados de PVP comercializados en el mercado.

**Tabla 4.** Grados de polivinilpirrolidona comercializados.

<b>PMp</b>	<b>Viscosidad de una solución al 20%, 25 °C (nPa)</b>	<b>Grado Comercial</b>
2 000-3 000	4	K12
7 000-11 000	5.5	K17
28 000-34 000	12	K25
44 000-54 000	20	K30
1 000 000-1 500 000	1000 a 4000	K90

PMp es el peso molecular promedio, nPa es nanopascales.

### **2.6.1. Absorción, distribución y eliminación**

Estudios realizados en ratas a las cuales se les administró la PVP marcada mostraron que menos del 0.5% de la dosis administrada se absorbe del tracto gastrointestinal. Este polímero se absorbe escasamente vía gastrointestinal y se detecta en la sangre después de su administración. Se retiene en el organismo dependiendo del peso molecular y se reporta que las células retículo-endoteliales son las que retienen por mayor tiempo este polímero, aunque las mitocondrias también retienen pequeñas cantidades que en pocos días son eliminadas sin afectar al organismo (Digenis y col, 1987). Este polímero no cruza la barrera hematoencefálica ni la barrera placentaria (Ravin y col, 1952). Se excreta por vía renal y se reporta que su vida media de eliminación depende también de su peso molecular. Se ha reportado un tiempo de vida media de eliminación de 12-72 horas para pesos moleculares en el rango de 25,000 a 40,000. Se elimina vía filtración glomerular (Burnette, 1962).

### 2.6.2. Toxicidad

Éste polímero es bien tolerado después de su administración oral por un periodo largo de tiempo, no es teratogénica, mutagénica ni carcinogénica. La dosis letal media en ratones es mayor a 15 g/Kg y en ratas de 10 g/Kg (BASF, 2007).

### 2.6.3. Efecto sobre la solubilidad y biodisponibilidad de los fármacos

La PVP de bajo peso molecular (K16, K25 y K30) se usa como agente solubilizante y dispersante en la preparación de formas farmacéuticas inyectables y orales. Un ejemplo típico es la formulación de un jarabe de paracetamol, en el cual la presencia del polímero (K25) incrementa la solubilidad del fármaco y reduce el sabor amargo (Wen y col, 2005). La dispersión de un fármaco en un acarreador inerte soluble en agua como éste polímero, en estado sólido, conocida como sistema de dispersión sólida, ha mostrado incrementar la disolución *in vitro* de muchos fármacos, tales como furosemina (Iannuccelli y col, 2000), clofazimina (Narang y Srivastava, 2002), Ionidamina (Palmieri y col, 2002) carbamazepina (Sethia y Squillante, 2004) y muchos otros fármacos poco solubles en agua.

Tantishaiyakul y col. (1996) reportan que una dispersión sólida de piroxicam-PVP K30 (1:4) incrementa la disolución 38 veces en comparación con el fármaco puro. La presencia de puentes de hidrógeno intermoleculares entre el piroxicam y el polímero producen cambios en la estructura cristalina del fármaco y, por lo tanto, en su solubilidad. Se ha observado que la solubilidad del fármaco en dispersiones sólidas con este polímero se ve afectada por el peso molecular y la concentración del este último.

Tantishaiyakul y col. (1999) evaluaron dispersiones sólidas de piroxicam con éste polímero grado K17 y K90. Los resultados mostraron que cuando se usa el polímero

grado K17 (1:1 hasta 1:5) se incrementó la velocidad de disolución en mayor proporción que cuando se usó el polímero grado K90.

En algunos fármacos se ha observado una relación entre el aumento en solubilidad con un incremento en la biodisponibilidad. Palmieri y col. (2002) reportan un incremento en la solubilidad acuosa de la lonidamina con una dispersión sólida de lonidamina:PVP K29 (1:9). Este incremento se vio reflejado en un aumento en la biodisponibilidad del fármaco cuando esta formulación se le administró a ratas, particularmente el valor de AUC del fármaco en plasma aumentó 1.9 veces en comparación con el fármaco solo. Este polímero también se ha usado para incrementar la solubilidad de ALB. Torrado y col. (1996) evaluaron dispersiones sólidas de este fármaco con la PVP grado K12 (1:10, 1:20 y 1:40). Los resultados mostraron que la eficiencia de disolución se incrementó significativamente en comparación con el fármaco solo (de 15 a 20 veces). También se observó que un aumento en la concentración del polímero incrementa la eficiencia de disolución, lo cual puede explicarse por el efecto humectante y solubilizante del polímero. El estudio con rayos X de estas formulaciones reveló que al incrementar la cantidad del polímero en las formulaciones, se encontró en mayor proporción de la forma amorfa del fármaco en las mezclas, lo cual explica la diferencia en la eficiencia de disolución ya que la forma amorfa es más soluble que la cristalina. Estos resultados muestran que los sistemas de dispersión sólida con polímeros mejoran disolución de fármacos con baja solubilidad acuosa como ha sido observado por otros autores (Kearney y col, 1994; Sethia y Squillante, 2004).

Mallick y col. (2003) evaluaron el mismo sistema de dispersión sólida de ALB con la PVP preparado por el método de co-disolución y evaporación de disolventes, encontrando un efecto similar al ya observado por Torrado y col. (1996), ya que demostraron que hay una disminución de la forma cristalina de el fármaco a medida que



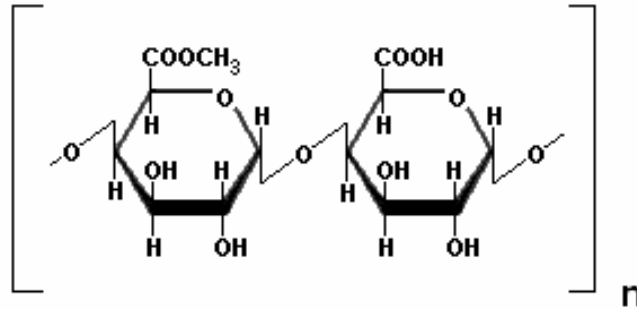
se incrementa la proporción del polímero en la dispersión. Además, la solubilidad y la velocidad de disolución también aumentaron de manera proporcional a la concentración del polímero. Recientemente, Kalaiselvan y col. (2006) reportan que una proporción 1:1 en una dispersión sólida de albendazol-polivinilpirrolidona es la más óptima para tener una formulación físicamente estable.

#### **2.6.4. Principales aplicaciones**

A nivel farmacéutico éste polímero tiene diversas aplicaciones. Se utiliza como aglutinante en la elaboración de cápsulas y tabletas; es útil como agente solubilizante en la preparación de soluciones oftálmicas, granulados y tabletas; como agente solubilizante en la preparación de inyectables y liofilizados orales; estabilizador de suspensiones, agente adhesivo en sistemas transdérmicos y geles; estabilizador de enzimas de diagnóstico y como mejorador de la biodisponibilidad de cápsulas, tabletas, pellets y supositorios (BASF, 2007).

#### **2.7. Pectina**

Las pectinas son una mezcla de polímeros ácidos y neutros muy ramificados y de alto peso molecular que están formadas fundamentalmente por largas cadenas de unidades de ácido galacturónico unidos por enlaces glicosídicos  $\alpha(1-4)$  (Figura 10). El ácido puede encontrarse con el grupo carboxilo libre o esterificado por metanol (metoxilado). También contiene azúcares neutros como la L-ramosa, la cual está también insertada en la cadena principal.

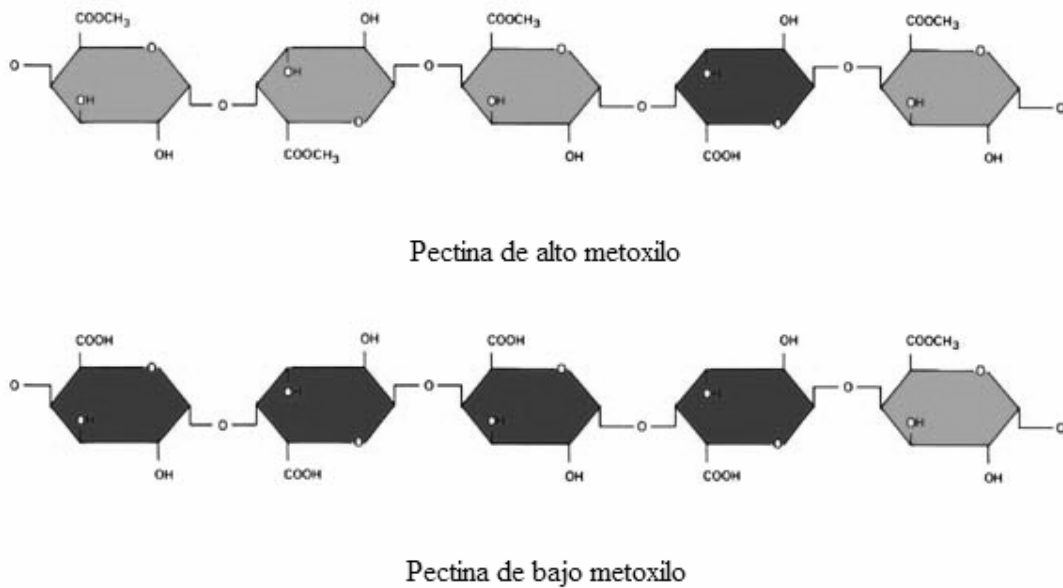


**Figura 10.** Estructura básica de la pectina.  $n$  es el número de unidades básicas en el polímero y varía dependiendo del grado de polimerización.

Las pectinas constituyen el 30% del peso seco de la pared celular primaria de las células vegetales. Son componentes de la dieta normal y se han aprobado por la FDA y por el comité de expertos de la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación para ser usadas como aditivos (WHO, 1974). En presencia de agua forman geles y son solubles en disoluciones acuosas. Se ha observado que a mayor grado de esterificación, las pectinas presenta una mayor solubilidad acuosa. Éstas pueden ser insolubles en presencia de calcio o de otros cationes bivalentes por la formación de pectatos cálcicos que precipitan en solución. También son insolubles en alcohol.

### 2.7.1. Tipos de pectinas

Comercialmente, las pectinas se dividen de acuerdo a su grado de esterificación, el cual se calcula con base en la proporción de los grupos carboxilo metilados entre los carboxilos totales de las moléculas de ácido galacturónico. Considerando esto las pectinas se dividen en pectinas de alto metoxilo cuyo grado de esterificación es mayor a 50% y de bajo metoxilo cuyo grado de esterificación es menor a 50%. Además, las pectinas de bajo metoxilo pueden ser amidadas o no (Figura 11).



**Figura 11.** Estructuras de pectinas de alto metoxilo y de bajo metoxilo.

### 2.7.2. Absorción y eliminación

Después de su ingestión, las pectinas son digeridas en la parte inferior del intestino. Un estudio en ratas reporta que el 20% de la pectina ingerida se detecta en las heces. Estudios en humanos revelan que más del 50% de las pectinas se digieren en el colon y que las enzimas bacterianas están involucradas en esta degradación (Khotimchenko y col, 2006).

### 2.7.3. Seguridad

Las pectinas son seguras cuando se ingieren a niveles razonables. En humanos se recomienda una dosis de 0-25 mg/Kg (Liu y col, 2003). En ratas la dosis donde no se observan efectos tóxicos corresponde a un 5% de la dieta normal, equivalente a 2500 mg/Kg de peso. Estudios realizados en ratas reportan que las pectinas no son teratogénicas ni tóxicas cuando se administran en las dosis recomendadas (WHO, 1974).

#### **2.7.4. Efecto sobre la solubilidad y biodisponibilidad de los fármacos**

Miyazaki y col. (2000) evaluaron una formulación de diltiazem con una mezcla de pectina K90 y hidroxipropilmetilcelulosa. Los resultados mostraron que una proporción 1:1 de los polímeros lograron una liberación sostenida del fármaco en comparación con el fármaco formulado sólo con etil-celulosa. Asimismo, se ha reportado que una solución acuosa de pectina del 1 al 1.5% peso/volumen adicionada con iones calcio logra la liberación sostenida de ambroxol en ratas, debido a que los iones liberados en el medio ácido del estómago provocan que el sistema fármaco: polímero gelifique *in situ*, lo cual causa una lenta liberación del fármaco. La biodisponibilidad del fármaco disminuye en un 64% en comparación con aquella obtenida con una formulación comercial (Kubo y col, 2004). Recientemente, un complejo de pectina:quitosan (1:9) con vancomicina, demostró una gran fuerza mucoadhesiva y la habilidad de hincharse en condiciones de pH alcalino, de tal forma que puede liberar lentamente el fármaco en condiciones alcalinas, las cuales prevalecen en el colon (Bigucci y col, 2008).

#### **2.7.5. Principales aplicaciones**

Comercialmente, las pectinas se utilizan como aditivos para dar consistencia a diversos productos en la industria alimentaria. A nivel farmacéutico son consideradas como acarreadores de fármacos cuya liberación es a nivel de colon (para acción sistémica o para el tratamiento tópico de enfermedades como colitis ulcerativa, carcinoma de colon, etc.). También son consideradas como candidatas para uso farmacéutico como acarreador de una variedad de fármacos para liberación controlada. La más atractiva propiedad de las pectinas a nivel industrial es su actividad gelificante, esta característica está determinada por el tipo, la concentración, el grado de esterificación, el grado de amidación, las modificaciones de los grupos hidroxilo, el pH de la solución, la

temperatura y la presencia de cationes. Todos estos parámetros son interdependientes y son proporcionales al peso molecular e inversamente proporcionales al grado de esterificación de la pectina. Las pectinas de alto peso molecular se han empleado como hidrogeles para la liberación de fármacos. Se ha observado que las pectinas de alto grado de esterificación presentan la formación de áreas hidrofóbicas paralelas al eje helicoidal, al cual puede expandirse tan extensamente que reduce dramáticamente la solubilidad acuosa de éstas. Las pectinas de alto grado de esterificación también gelifican en presencia de grandes concentraciones de azúcar. Las pectinas de bajo grado de esterificación son altamente solubles en agua y gelifican sólo a valores de pH extremadamente bajos en solución o en presencia de cationes divalentes (Liu y col, 2003).

El efecto de la adición de diferentes polímeros como hidroxipropil-metilcelulosa, carboximetilcelulosa, pectina y la PVP sobre la solubilidad de ALB contenido en el sistema binario fármaco- $\beta$ -ciclodextrina fue evaluado recientemente por Rivas (2007). Los resultados mostraron que un 5% de pectina ó PVP incrementan significativamente la solubilidad acuosa y la velocidad de disolución de este fármaco. Es por ello que en el presente proyecto se decidió evaluar la influencia de estos dos polímeros sobre la eficacia y biodisponibilidad de éste fármaco en presencia de  $\beta$ -ciclodextrina.

### **3. Justificación del trabajo**

El albendazol es el fármaco de primera elección para el tratamiento de la neurocisticercosis. Sin embargo, su absorción es baja, por lo que se requiere del uso de altas dosis y larga duración del tratamiento con resultados parciales. Dado que esta enfermedad se presenta particularmente en países pobres, la investigación de nuevas moléculas y/o formulaciones de albendazol no es prioritaria para la industria farmacéutica trasnacional, por lo que es necesario que nuestro país continúe con la investigación preclínica de nuevas moléculas, así como con la búsqueda de nuevas formulaciones de albendazol que sean más efectivas para el tratamiento de este padecimiento.

#### **4. Hipótesis**

Las hipótesis planteadas fueron las siguientes.

1. Al menos uno de los análogos de albendazol presentará actividad cisticida.
2. Las nuevas formulaciones de albendazol presentarán mayor eficacia y biodisponibilidad que la suspensión comercial.

## 5. Objetivo general

Encontrar una nueva alternativa para el tratamiento farmacológico de la neurocisticercosis.

### 5.1. Objetivos específicos

- a) Evaluar la actividad *in vitro* de los análogos al albendazol en cisticercos de *Taenia crassiceps*.
- b) Evaluar la actividad *in vivo* del análogo que haya mostrado una actividad *in vitro* semejante a la obtenida con sulfóxido de albendazol, empleando para ello el modelo de cisticercosis murina.
- c) Evaluar la actividad *in vivo* de las nuevas formulaciones de albendazol, empleando el modelo de cisticercosis murina.
- d) Caracterizar la farmacocinética de la formulación de albendazol que presente la mejor actividad cisticida.

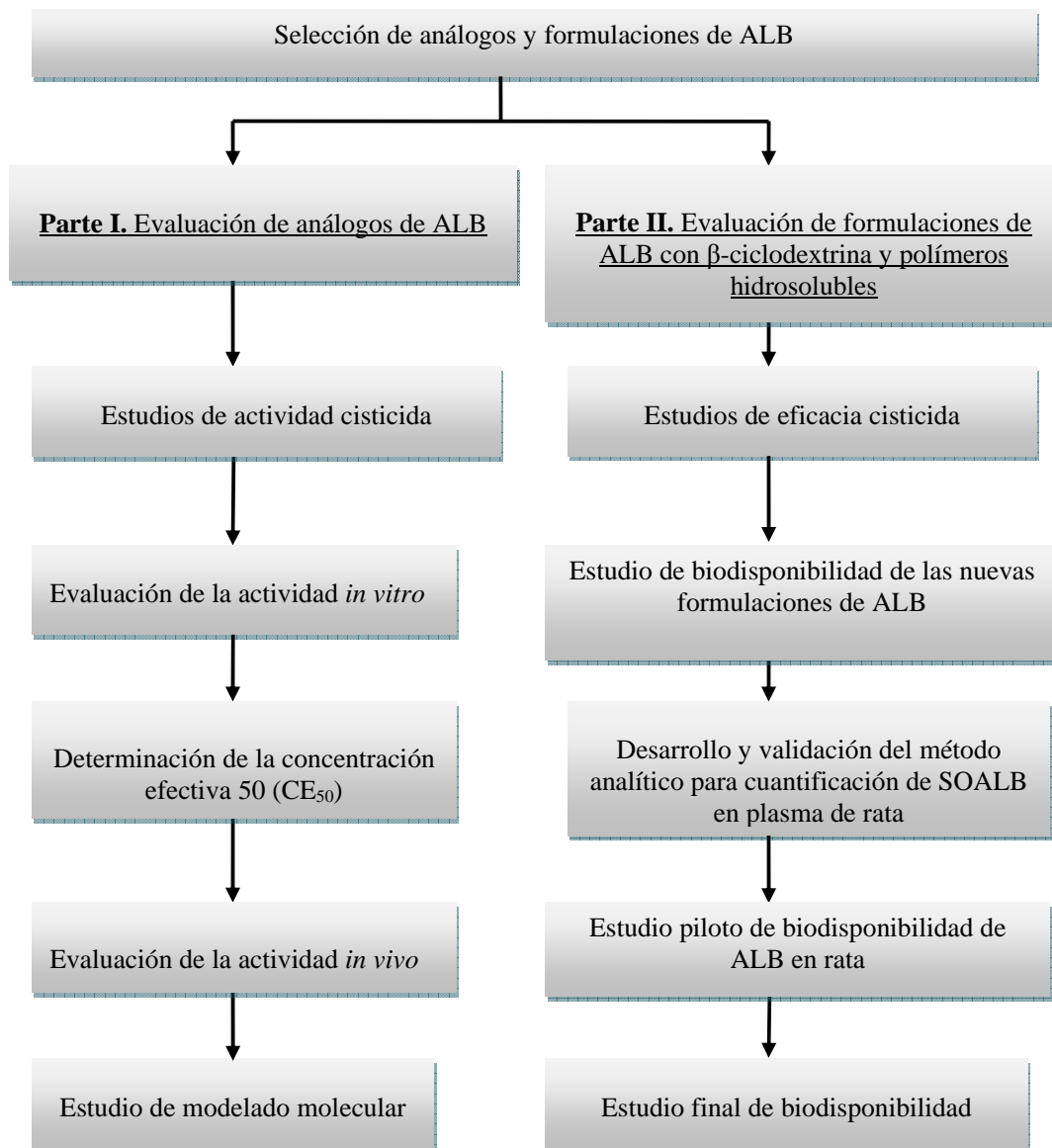


## 6. Parte experimental

Para cumplir con los objetivos, el proyecto se dividió en dos partes:

- Parte I. Evaluación de análogos de ALB.
- Parte II. Evaluación de formulaciones de ALB con  $\beta$ -ciclodextrina y polímeros hidrosolubles.

El diagrama de trabajo utilizado se muestra en el esquema 1.



**Esquema 1.** Diagrama de trabajo utilizado en el proyecto.

## **6.1 Parte I. Evaluación de análogos de albendazol**

### **6.1.1 Estudios de actividad cisticida**

#### **6.1.1.1 Reactivos y equipo**

- Sulfóxido de albendazol (99% de pureza, fue donado gentilmente por la M. en C. Alicia Hernández Campos de la Facultad de Química de la UNAM)
- Albendazol (GlaxoSmithKline, México)
- Medio de cultivo Dulbecco's Modificado (Sigma-Aldrich CO, USA)
- Suero fetal bovino (GIBCO Invitrogen CO, USA)
- Antibiótico-antimicótico (penicilina G, estreptomicina) (GIBCO Invitrogen CO, USA)
- Bicarbonato de sodio (Sigma Chemical CO, USA)
- Hidróxido de sodio RA ( J.T. Baker, USA)
- Solución salina al 0.9 % estéril (PiSA, México)
- Dimetil sulfóxido RA (Sigma-Aldrich CO, USA)
- Etanol RA (J.T. Baker, USA)
- Metanol RA (J.T. Baker, USA)
- Frascos de cultivo de 50 ml con filtro (Corning Inc, USA)
- Membranas de filtración de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Ireland)
- Campana de flujo laminar, modelo HB 2448 (Holten, USA)
- Incubadora de temperatura controlada y con flujo de CO<sub>2</sub> modelo 304 (Napco, USA)
- Microscopio de luz invertida modelo ICM 405 (Carl Zeiss Inc, USA)
- Cremofor EL (Fluka, Alemania)
- Jeringas de insulina de 1 mL (Becton Dickinson, México)
- Tubos de centrífuga de 15 mL fondo cónico (Kimax, USA)

- Sonda esofágica para ratón curva punta bola, calibre 18 de acero inoxidable (Popper and CO, USA)
- Cajas de acrílico de 25x15, con filtro (Nalgene CO, USA)

#### *Material Biológico*

- Ratones hembras BALB-C de 8 semanas de edad
- Parásitos: Cisticercos de *Taenia crassiceps* cepas ORF y WFU los cuales se obtuvieron del peritoneo de ratones previamente infectados. Los ratones infectados con cisticercos fueron donados gentilmente por el Dr. Javier Ambrosio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los parásitos se lavaron con solución salina 0.9%. Para los experimentos sólo se seleccionaron los cisticercos viables. Durante la evaluación de actividad cisticida tanto *in vivo* como *in vitro*, los cisticercos se mantuvieron por inoculación seriada.

#### **6.1.1.2 Preparación de soluciones y medio de cultivo**

##### *Preparación del medio de cultivo*

El medio de cultivo utilizado para los estudios *in vitro* se preparó de la siguiente manera: Se pesaron 17 g de medio de cultivo Dulbecco's modificado, los cuales se disolvieron en 800 mL de agua destilada, se agregaron 3.7 g de bicarbonato de sodio y se agitó hasta disolver. El pH del medio se ajustó a 7.3 con hidróxido de sodio 0.1N y se aforó a 1000 mL con agua destilada. A 900 mL de medio se le agregó 100 mL de suero fetal bovino y 10 mL de antibiótico-antimicótico (penicilina G, estreptomycin). El medio se filtró a través de membranas estériles de 0.22 µm y se guardó en refrigeración hasta el momento en que fue utilizado.

### *Preparación de soluciones de análogos de albendazol*

Los análogos de albendazol se disolvieron en dimetil sulfóxido para obtener una solución de 1 mg/mL de cada uno de ellos. Se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L de esta solución y se transfirió a un matraz de 10 mL, la cual se llevó a volumen con agua, esta solución contenía 10  $\mu$ g/mL. De esta solución se tomó una alícuota que fue adicionada al medio de cultivo para obtener concentraciones de cada compuesto de 0.28  $\mu$ M y 1.7  $\mu$ M, equivalentes a la concentración efectiva 50 y 90 del SOALB, previamente determinada en cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF (Palomares y col, 2004). Como estándar de comparación se preparó el SOALB a las mismas concentraciones usando el mismo procedimiento y como control se preparó una solución de dimetil sulfóxido al 0.2 %.

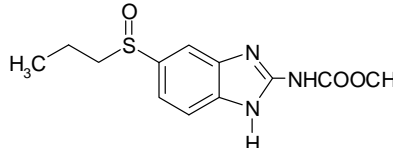
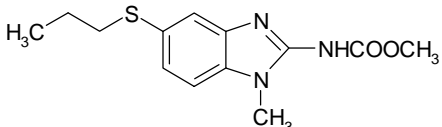
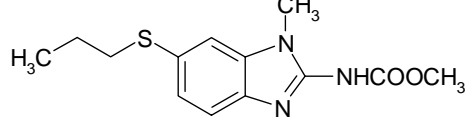
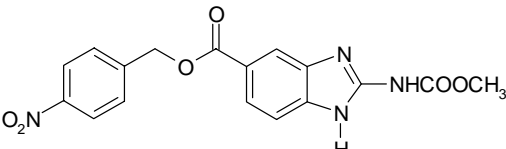
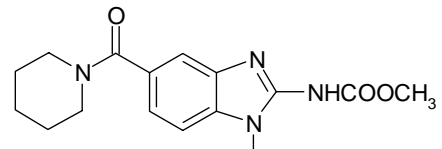
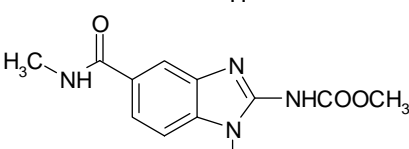
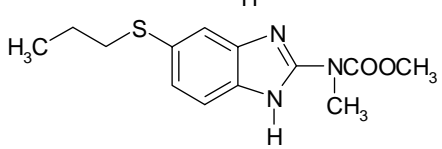
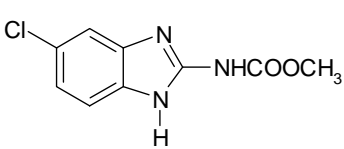
#### **6.1.1.3 Evaluación de la actividad cisticida *in vitro* de los análogos de albendazol en cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF**

Los compuestos evaluados se muestran en la tabla 5. Todos ellos fueron sintetizados en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM por el Dr. Francisco Hernández Luís.

Para la evaluación de la actividad cisticida, se depositaron en cajas de cultivo 5 mL de medio adicionado con cada uno de los compuestos a las concentraciones seleccionadas, se depositaron 25 cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF y se incubaron a 37°C y una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> durante once días. Como estándar de comparación se utilizó el SOALB y como control se preparó una solución de dimetil sulfóxido al 0.2 %. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada concentración y cada compuesto. La mortalidad se registró cada tercer día con ayuda de un microscopio de luz invertida y los criterios de mortalidad fueron: pérdida de fluido quístico, pérdida del movimiento

del parásito y degradación de la membrana. El día 11, se realizó una prueba adicional, la tinción de los parásitos con azul de tripano, que es un marcador de viabilidad celular, para corroborar la muerte de los parásitos.

**Tabla 5.** Estructuras de los análogos de albendazol evaluados

Nombre químico	Clave	Estructura	PM (ClogP)
[5-(Propilsulfinil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	<b>SOALB</b>		281.30 (0.86)
[1-Metil-5-(propiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	<b>FHL13</b>		279.36 (3.13)
[1-Metil-6-(propiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	<b>FHL14</b>		279.36 (3.13)
2-([Metoxicarbonil]amino)-1 <i>H</i> -bencimidazol-5-carboxilato de 4-nitrobencilo	<b>FHL18</b>		370.32 (2.94)
[(5-piperidin-1-ilcarbonil)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	<b>FHL19</b>		302.33 (0.68)
{5-[(Metilamino)carbonil]-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il}carbamato de metilo	<b>NLB24</b>		248.24 (0.1)
Metil[5-(propiltio)-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il]carbamato de metilo	<b>JPV001</b>		279.36 (2.97)
(5-Cloro-1 <i>H</i> -bencimidazol-2-il)-carbamato de metilo	<b>JVG40</b>		225.63 (2.06)

SOALB: sulfóxido de albendazol, PM: peso molecular, ClogP calculado con el software ACDlabs (ACD Inc, Canada).

#### **6.1.1.4. Determinación de la CE<sub>50</sub> de los compuestos FHL18 y FHL19 en cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa WFU**

Considerando que los compuestos FHL18 y FHL19 presentaron actividad cisticida, se procedió a realizar otro estudio para calcular la CE<sub>50</sub>. Para ello se prepararon diferentes soluciones de cada compuesto, el rango de concentración fue de 0.14 a 2.7 µM y se siguió el procedimiento de incubación de los parásitos y la evaluación de la mortalidad descrito en la sección 6.1.1.3. Como estándar de comparación se preparó el SOALB a las mismas concentraciones que los análogos y como control se preparó una solución de dimetil sulfóxido al 0.2 %.

#### **6.1.1.5. Evaluación de la actividad cisticida *in vivo* de albendazol y FHL18 en cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa WFU**

Para el estudio de actividad *in vivo* se empleó el modelo de cisticercosis murina con la cepa WFU. La infección experimental se llevó a cabo de la siguiente manera: A ratones hembras BALB/c de 8 semanas de edad se les inyectó por vía intraperitoneal de 30 a 35 parásitos por ratón. Los animales se mantuvieron en condiciones adecuadas de temperatura (24-25°C), humedad (55% ± 5%) y ciclo luz/oscuridad (12h/12h) especificadas por la NOM-062-ZOO-1999, recibieron agua y comida *ad libitum*. Después de 1 mes de infección, los animales se dividieron en grupos para recibir el tratamiento farmacológico.

Previo al estudio de actividad *in vivo*, se determinó la dosis efectiva del ALB, el cual se utilizó como compuesto de referencia, dado que no existe información de su actividad en la cepa WFU de *Taenia crassiceps*. Para el estudio se utilizó el fármaco puro (materia prima de GlaxoSmithKline, Lote: F030), el cual se suspendió en cremofor al 2% en agua. El rango de dosis evaluado fue de 15 a 250 mg/Kg.

Se emplearon 36 ratones infectados con cisticercos de *Taenia*, los cuales se dividieron al azar en 6 grupos de 6 animales. A cada uno de los grupos se les administró una dosis diferente del fármaco una vez al día durante 5 semanas consecutivas por vía intragástrica. Al grupo control se le administró una solución de cremofor al 2% durante el mismo periodo. Concluido el tratamiento farmacológico, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajeron los parásitos de la cavidad peritoneal y se depositaron en una caja petri para su conteo. La respuesta al tratamiento se reportó como el porcentaje de eficacia y se calculó con la fórmula 1. Donde Pcontrol es el número de parásitos encontrados en el tratamiento control, Ptrata es el número de parásitos encontrados después de cada tratamiento.

$$\% \text{ Eficacia} = \left[ \frac{\text{Pcontrol} - \text{Ptrata}}{\text{Pcontrol}} \right] \times 100 \quad \text{Fórmula (1)}$$

#### 6.1.1.6. Evaluación de la eficacia *in vivo* del análogo FHL18

Para la evaluación de eficacia cisticida *in vivo* se seleccionó el compuesto FHL18 el cual presentó la mejor eficacia *in vitro*. La dosis utilizada fue de 216.6 mg/Kg de peso que es una dosis equimolar a la dosis de 150 mg/Kg de ALB (fármaco de referencia), que fue la que presentó la mejor eficacia cisticida *in vivo*. Para el estudio se preparó una suspensión del compuesto FHL18 ó del fármaco de referencia de 30 mg/mL en una solución de cremofor al 2% en agua. Se emplearon un total de 18 ratones previamente infectados con cisticercos de *Taenia*, y se dividieron en 3 grupos de 6 animales. Al grupo 1 se le administró el ALB, al grupo 2 el FHL18 y al grupo 3 una solución de cremofor al 2% en agua (grupo control). A cada ratón se le administró el fármaco correspondiente vía intragástrica una vez al día durante 5 semanas consecutivas,

empleando una cánula de acero inoxidable. Concluido el periodo de tratamiento, los parásitos se extrajeron del peritoneo, se lavaron 3 veces con solución salina, se homogenizaron a fin de romper las membranas y liberar el fluido quístico, y posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm por 25 minutos. El sedimento se transfirió a frascos de vidrio, se congeló por 4 horas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se secó por liofilización y se pesó. La eficacia se calculó en base al peso seco utilizando la fórmula 1 (página 52).

Los resultados de eficacia se compararon estadísticamente mediante un análisis de varianza y una prueba de comparaciones múltiples (Tukey) a un nivel de significancia de 0.05 ( $P < 0.05$ ).



## **6.2 Parte II. Evaluación de formulaciones de albendazol con $\beta$ -ciclodextrina y polímeros hidrosolubles**

### **6.2.1 Reactivos y equipo**

- Sulfóxido de albendazol (99% de pureza, fue donado gentilmente por la M. en C. Alicia Hernández Campos de la Facultad de Química de la UNAM)
- Metanol grado HPLC (Mallinckrodt Baker, México)
- Diclorometano, GR (Mallinckrodt Baker, México)
- Éter etílico, GR (J.T. Baker, USA)
- Cloroformo, GR (J.T. Baker, USA)
- Fosfato monobásico de potasio, GR (J.T. Baker, USA)
- Hidróxido de sodio, GR (J.T. Baker, USA)
- Agua grado HPLC
- Heparina, sol. Inyectable de 1000 UI/mL (PiSA, México)
- Clorhidrato de ketamina, sol. inyectable 100 mg/ mL (Anesket, PiSA, México)
- Clorhidrato de xilacina, sol. inyectable 20 mg/mL (Procin, PiSA, México)
- Cloruro de sodio, sol. Inyectable 0.9% (PiSA, México)
- Cloruro de Benzalconio, GR ( JT Baker, USA)
- Alcohol, GR (JT Baker, USA)
- Tubos de vidrio con tapón rosca de 10 mL (Kimax, USA)
- Tubos de ensayo de 10 mL (Kimax, USA)
- Tubos para microcentrífuga de 1 y 2 mL (Eppendorf, USA)
- Microviales de 200  $\mu$ L (Agilent Technologies, USA)
- Sonda esofágica para rata curva de punta bola, calibre 16 de acero inoxidable
- Sonda esofágicas para ratón curva punta bola, calibre 20 de acero inoxidable
- Jeringas estériles de 1, 3 y 10 mL (Becton-Dikinson, USA)
- Centrifuga Beckman TJ-6 (Beckman, USA)

- Vórtex vertical multi-pulso (Glas-Col, USA)
- Ultracongelador REVCO a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  (Kendro Laboratory Products, USA)

#### *Material Biológico*

- Ratas Wistar de  $280 \pm 30$  g
- Ratones hembras BALB-C de 8 semanas de nacidas
- Parásitos: Cisticercos de *Taenia crassiceps* cepas ORF y WFU los cuales se obtuvieron del peritoneo de ratones previamente infectados. Los parásitos se lavaron con solución salina 0.9% y para los experimentos sólo se seleccionaron los cisticercos viables. Los ratones infectados con cisticercos fueron donados gentilmente por el Dr. Javier Ambrosio de la Facultad de Medicina de la UNAM.

#### **6.2.2 Estudio de eficacia cisticida de nuevas formulaciones de albendazol**

Las formulaciones ternarias estudiadas fueron elaboradas en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, por el M. en C. Cesar Rivas y la Dra. Ma. Josefa Bernad Bernad y fueron las siguientes:

- I. Formulación de ALB con  $\beta$ -ciclodextrina (1:1, molar:molar) (ALB- $\beta$ CD)
- II. Formulación de ALB con  $\beta$ -ciclodextrina (1:1, molar:molar) y con 5% de pectina (ALB- $\beta$ CD-PEC)
- III. Formulación de ALB con  $\beta$ -ciclodextrina (1:1, molar:molar) y con 5% de polivinilpirrolidona (ALB- $\beta$ CD-PVP)
- IV. Suspensión comercial de ALB (Zentel, GlaxoSmith-Kline Lote: 33001038) el cual se uso como producto de comparación.

Para administrar las formulaciones con ciclodextrinas se prepararon dispersiones en agua destilada de 40 mg/mL. Para el estudio se administró una dosis equivalente a 150 mg/Kg de ALB. El estudio se llevó a cabo empleando el modelo de cisticercosis murina causada por *Taenia crassiceps* cepa WFU. El procedimiento de infección experimental de los ratones se realizó como se describe en la sección 6.1.1.5. Se emplearon un total de 30 ratones, los cuales se dividieron en 5 grupos de 6 animales. A cada grupo se le administró un tratamiento diferente: al grupo 1 el Zentel, al grupo 2 la formulación ALB- $\beta$ CD, al grupo 3 la formulación ALB- $\beta$ CD-PEC, al grupo 4 la formulación ALB- $\beta$ CD-PVP y al grupo 5 (control) se le administró una solución de cremofor al 2%. A cada ratón se le administró la formulación vía intragástrica una vez al día durante 5 semanas. Al final del tratamiento, los ratones se sacrificaron y los parásitos se extrajeron del peritoneo. La eficacia se determinó con base en el peso seco de los parásitos de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 6.1.1. Los resultados de eficacia de cada tratamiento se compararon estadísticamente empleando un análisis de varianza seguida de una prueba de comparación múltiple (Tukey), empleando un nivel de significancia de 0.05 ( $P < 0.05$ ).

### **6.2.3 Estudio de biodisponibilidad**

#### **6.2.3.1 Desarrollo y validación del método analítico para cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma de rata**

Aún cuando se han reportado diversos métodos para cuantificar el SOALB, fue necesario efectuar una serie de pruebas para seleccionar la fase móvil y el método de extracción y de esta manera adecuarlo a las condiciones del estudio.

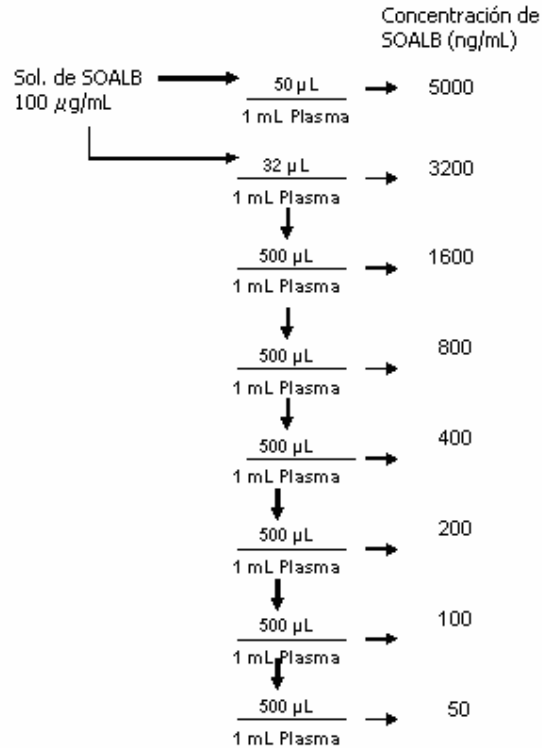
*Preparación de la fase móvil y soluciones de trabajo*

Preparación de la fase móvil. Se preparó una solución amortiguadora de fosfatos 25 mM pH 5.6 de la siguiente manera. Se pesaron 6.9 g de fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), se disolvió con 500 mL de agua destilada y se llevó al aforo en un matraz volumétrico de 1L. El pH se ajustó a 5.7 con una solución de NaOH 1 N. La fase móvil consistió en una mezcla de la solución amortiguadora de fosfatos con metanol 65:35.

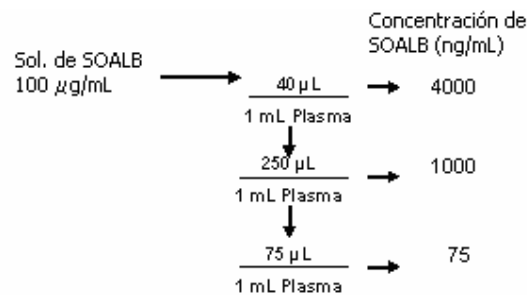
Solución patrón de sulfóxido de albendazol. Se pesó con exactitud 10 mg de SOALB y se transfirió a un matraz volumétrico de 10 ml, se disolvió con 5 mL de metanol y se llevó al aforo con el mismo disolvente para obtener una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  de SOALB. De la solución anterior se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  a un matraz de 10 mL y se aforó al volumen con metanol para obtener una concentración final de 10  $\mu\text{g/mL}$  (solución de trabajo).

Solución patrón de carbamazepina. Se pesó con exactitud 10 mg de carbamazepina (la cual se usó como estándar interno), se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvió con 5 mL de metanol y se llevó al aforo con el mismo disolvente para obtener una concentración de 1 mg/mL. De la solución anterior se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  a un matraz de 10 mL y se llevó al aforo con metanol para obtener una concentración final de 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Curva de calibración de sulfóxido de albendazol y puntos control: A partir de la solución de trabajo de SOALB de 10  $\mu\text{g/mL}$  se realizaron diluciones para obtener los estándares correspondientes de la curva de calibración y los puntos control, tal y como se muestra en el esquema 2 y 3.



**Esquema 2.** Preparación de la curva de calibración de sulfóxido de albendazol (SOALB) en plasma



**Esquema 3.** Preparación de los puntos control de sulfóxido de albendazol (SOALB) en plasma

*Proceso de extracción*

En un tubo de vidrio de 10 mL con tapón de rosca se colocó una alícuota de 200 µL de plasma, se adicionaron 20 µL de una solución de carbamazepina (10 µg/mL) y 4 mL de mezcla de extracción (éter:diclorometano:cloroformo, 60:30:10, v/v/v), se agitó a 95

rpm durante 5 min. La mezcla se centrifugó a 3000 rpm por 25 min y se congeló a -70°C durante 30 min. La fase orgánica se decantó y se transfirió a un tubo de ensayo para ser evaporada a sequedad en baño maría a 45°C bajo corriente de N<sub>2</sub>. El residuo se reconstituyó con 50 µL de una mezcla de metanol:agua:cloroformo (70:30:10) y se inyectaron 10 µL en el sistema cromatográfico.

#### *Condiciones cromatográficas*

Las condiciones cromatográficas establecidas fueron las siguientes:

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent Modelo 1100 con detector de longitud de onda variable UV-Vis, con microcelda de 5 µL, 6 mm, 120 bar (Agilent Technologies Inc, CA, USA)
- Columna Symmetry Shield RP18 ( 5 µm, 4.6 x 250 mm) (Waters Corporation, MA, USA)
- Flujo de la fase móvil: 0.4 mL/min
- Longitud de onda: 295 nm
- Volumen de Inyección: 10 µL
- Tiempo de corrida: 17 min

#### *Validación del método analítico*

El método desarrollado se validó con el fin de contar con un método confiable para ser utilizado en los estudios de farmacocinética. Los parámetros considerados para la validación fueron los siguientes: selectividad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, precisión, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud y recobro absoluto.

Selectividad: La selectividad del método se evaluó analizando 5 muestras de plasma de ratas diferentes. Se observó que no se presentara ninguna impureza o componentes endógenos que pudieran interferir en la determinación del analito o del estándar interno.

Límite de detección: El límite de detección se determinó realizando diluciones sucesivas de la concentración de 50 ng/mL, analizándolas por el método propuesto y buscando la dilución que produjera una señal de 5 veces la señal de ruido.

Límite de cuantificación: El límite de cuantificación se determinó analizando por quintuplicado la concentración más baja del intervalo (50 ng/mL).

Linealidad: Para determinar si la relación de alturas de SOALB/estándar interno es lineal, se prepararon 3 curvas patrón en plasma, en el intervalo de concentraciones de 50 a 5000 ng/mL de acuerdo al procedimiento descrito en la página 59. Para cada curva se determinó el coeficiente de correlación, la pendiente y la ordenada al origen.

Precisión y exactitud: La precisión y la exactitud se evaluaron mediante el análisis de los puntos control a tres niveles de concentración (alta, media y baja) dentro del rango establecido. Se prepararon 5 replicados para cada nivel de concentración. Las concentraciones evaluadas fueron de 75, 1000 y 4000 ng/mL, éstas fueron preparadas por quintuplicado en un solo día. La precisión se verificó mediante el coeficiente de variación porcentual de la serie de medidas (menor al 10%) y la exactitud mediante la desviación estándar absoluta, la cual debe ser menor al 15 % y que se calculó con la fórmula 2.

Formula 2

$$DE_{abs} = \frac{(C_T - C_R)}{(C_T)} \times 100$$

Donde  $DE_{abs}$  es la desviación estándar absoluta,  $C_T$  es la concentración de sulfóxido adicionado a las muestras y  $C_R$  es la cantidad recuperada de SOALB en ng/mL.

Recobro absoluto: El recobro de las muestras plasmáticas se evaluó en todo el rango de concentraciones de la curva patrón. Para ello se prepararon 3 curvas de SOALB en plasma en el intervalo de concentración de 50 a 5000 ng/mL. Al mismo tiempo se prepararon 3 curvas de en metanol a las mismas concentraciones y se determinó el porcentaje de recobro comparando la respuesta promedio obtenida en plasma con la respuesta promedio obtenida en solución. Para considerarse el recobro aceptable, el porcentaje no tendría que ser necesariamente del 100% pero debe ser reproducible en cada nivel de concentración.

### **6.2.3.2 Estudio piloto de biodisponibilidad de albendazol en rata**

Se realizó un estudio preliminar con el fin de establecer tanto las condiciones del estudio (dosis, tiempos de muestreo, etc.), como para evaluar si el método analítico desarrollado era adecuado para la cuantificación de SOALB.

El estudio se llevó a cabo en 10 ratas de la cepa Wistar macho de 280 a 300 g de peso las cuales se mantuvieron en condiciones adecuadas de temperatura, humedad y ciclo de luz-oscuridad (12 h /12 h) y que permanecieron en ayuno 12 horas previas al estudio.

La ratas se anestesiaron con una mezcla de ketamina:xilacina (ketamina de 50 mg/Kg y xilacina 10 mg/Kg) y se colocó una cánula de polipropileno en la vena lateral de la cola para la colección de las muestras de sangre.

A cada una de las ratas se les administró una dosis única de ALB de 15 mg/Kg de peso vía intragástrica. Para ello, se preparó una suspensión del fármaco conteniendo 10 mg/mL en cremofor al 2%. Se tomó una muestra de sangre de 400  $\mu$ L de la vena lateral de la cola de la rata antes y a los 15 y 30 min, 1, 2, 3, 4, 8, 10, 12 y 24 horas después de la administración del fármaco. Las muestras de sangre se colectaron en tubos heparinizados eppendorf de 2 mL, se centrifugaron a 6000 rpm por 6 min, se separó el



plasma y se guardó a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. La concentración plasmática de sulfóxido se determinó por cromatografía de líquidos empleando el método analítico previamente descrito.

### **6.2.3.3 Estudio de biodisponibilidad de nuevas formulaciones de albendazol**

Tomando en consideración que la formulación ternaria de ALB- $\beta$ CD-PVP fue la que presentó la mayor actividad cisticida se seleccionó a esta para determinar su biodisponibilidad. Con el propósito de determinar el efecto de la inclusión del polímero hidrosoluble, PVP en la formulación binaria de ALB con  $\beta$ -ciclodextrina, se determinó también la biodisponibilidad de este sistema binario. Las formulaciones evaluadas fueron:

- I. Formulación de ALB con  $\beta$ -ciclodextrina (1:1, molar:molar) (ALB- $\beta$ CD)
- II. Formulación de ALB con  $\beta$ -ciclodextrina (1:1, molar:molar) y con 5% de polivinilpirrolidona (ALB- $\beta$ CD-PVP)
- III. Suspensión comercial de ALB (Zentel®, GlaxoSmithKline, México, Lote: 33001038) el cual se uso como producto de comparación.

Para llevar a cabo el estudio se administró una dosis oral única de ALB de 10 mg/Kg de peso. Se prepararon dispersiones en agua de cada una de las formulaciones de 40 mg/mL para su administración. El estudio se realizó en ratas de la cepa Wistar macho de  $280 \pm 30$  g de peso y se emplearon un total de 42. Los animales permanecieron en ayuno 12 horas previas al estudio. Se tomaron muestras de sangre de la cola de la rata, antes y a los 15 y 30 min, 1, 2, 3, 4, 8, 10 y 12 horas después de la administración del fármaco. Las muestras de sangre se colectaron en tubos heparinizados eppendorf de 1 mL y se centrifugaron a 6000 rpm por 6 min, se separó el plasma y se guardó a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

hasta su análisis. La concentración plasmática de SOALB se determinó empleando el método analítico previamente validado.

Se determinaron los siguientes parámetros: concentración plasmática máxima (C<sub>max</sub>), tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima (T<sub>max</sub>) y área bajo la curva del perfil plasmático (AUC). Para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos se utilizó el programa WinNonlin 4.0 (Pharsight, Mountain View, CA, USA), empleando el modelo no compartimental. Los resultados de cada formulación se compararon estadísticamente mediante un análisis de varianza seguida de una prueba de comparación múltiple (Tukey) empleando un nivel de significancia de 0.05 ( $P < 0.05$ ).

## 7. Resultados y discusión

### 7.1 Parte I. Evaluación de análogos de albendazol

#### 7.1.1 Estudios actividad cisticida *in vitro*

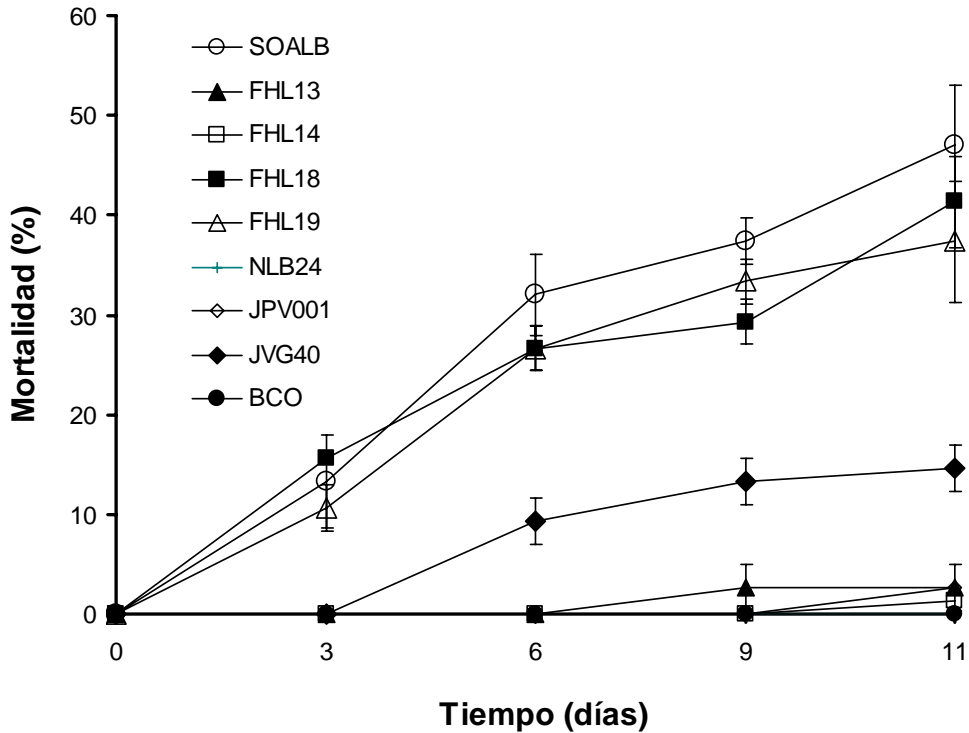
Es importante destacar que en el campo de la investigación de nuevas moléculas, uno de los primeros pasos a seguir es la evaluación de su eficacia *in vitro*, en donde la molécula se enfrenta con el sitio o vector blanco. En esta etapa todas las moléculas fallan, o al menos una buena parte de ellas. Superada esta etapa, se sigue con su evaluación *in vivo*, donde se incluye eficacia, toxicidad, seguridad, etc. En esta etapa otra buena parte de las moléculas se descartan, ya que en muchas ocasiones en el desarrollo molecular no se consideran propiedades fisicoquímicas compatibles con las condiciones biológicas, y en muchos de los casos la toxicidad del compuesto supera a su efectividad.

##### 7.1.1.1. Actividad cisticida de compuestos contra cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF

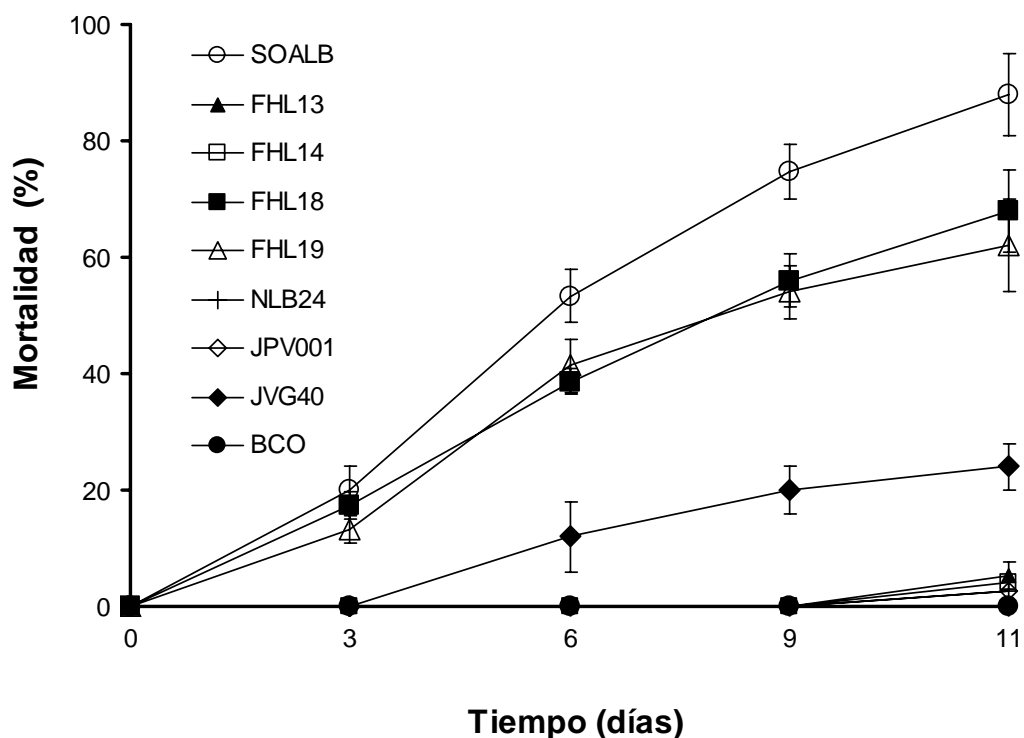
En la figura 12 se muestra el curso temporal de la mortalidad de cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF frente a los compuestos evaluados a una concentración de 0.28  $\mu\text{M}$ , mientras que en la figura 13 se muestran los resultados obtenidos al emplear la concentración de 1.7  $\mu\text{M}$ . Los resultados muestran que los compuestos que presentaron actividad cisticida a la concentración de 0.25  $\mu\text{M}$  fueron el FHL18, FHL19 y el JVG40, aunque la actividad de este último fue pobre comparada con los otros dos. Se observó que la actividad de estos análogos fue tiempo-dependiente igual que la exhibida con el SOALB.

Al evaluar una concentración mayor (1.7  $\mu\text{M}$ ) la actividad cisticida de los compuestos FHL18, FHL19 y el JVG40 se incrementó, lo cual indica que la actividad de estos compuestos es también concentración-dependiente. Este efecto concentración-tiempo-

dependiente concuerda con el efecto previamente obtenido para SOALB (Palomares y col, 2004). Los análogos que no presentaron actividad cisticida a la concentración de 0.28  $\mu\text{M}$  tampoco la presentaron a una concentración de 1.7  $\mu\text{M}$ .



**Figura 12.** Curso temporal de mortalidad de cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF después de su incubación en 0.28  $\mu\text{M}$  de sulfóxido de albendazol (SOALB) y de análogos de albendazol. Cada punto representa el promedio de parásitos muertos  $\pm$  DE (n=3).



**Figura 13.** Curso temporal de mortalidad de cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF después de su incubación en  $1.7 \mu\text{M}$  de sulfóxido de albendazol (SOALB) y de análogos de albendazol. Cada punto representa el promedio de parásitos muertos  $\pm$  DE (n=3).

En la tabla 6 se resumen los resultados de la evaluación *in vitro* a las dos concentraciones evaluadas. En ella se puede observar que la actividad de los compuestos FHL18 y FHL19 fue cercana a la encontrada con el SOALB.

La observación microscópica permitió determinar que los compuestos FHL18 y FHL19 presentaron un efecto similar al del sulfóxido, causando pérdida gradual de fluido quístico y la desintegración parcial o total de la membrana de los parásitos, lo cual es característico de los benzimidazoles (Ingold y col, 1999). Considerando que estos compuestos son análogos al ALB, es probable que su mecanismo de acción sea semejante. Sin embargo, se requieren estudios adicionales como determinar los cambios a nivel ultraestructural de los parásitos expuestos a estas moléculas *in vitro*, donde se podrían observar los efectos sobre el tejido parasitario, el efecto de estos compuestos

sobre proteínas de membrana parasitaria, básicas para su sobrevivencia, usando anticuerpos para miosina, actina y tubulina helmíntica (Ambrosio y col, 2003; González-Malerva y col, 2004).

**Tabla 6.** Actividad cisticida *in vitro* de sulfóxido de albendazol (SOALB) y de análogos de albendazol sobre cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

Clave	Mortalidad (%) $\pm$ DE	
	0.28 $\mu$ M	1.7 $\mu$ M
SOALB	46 $\pm$ 5	88 $\pm$ 7
FHL13	3 $\pm$ 2.3	5 $\pm$ 2.3
FHL14	1 $\pm$ 0.3	4 $\pm$ 0
FHL18	41 $\pm$ 1.6	68 $\pm$ 7
FHL19	37 $\pm$ 6.1	62 $\pm$ 8
NLB24	0	3 $\pm$ 4.6
JPV001	3 $\pm$ 2.3	3 $\pm$ 2.3
JVG40	15 $\pm$ 2.3	23 $\pm$ 2.3

DE es desviación estándar

La mayor parte de los estudios de eficacia cisticida *in vitro* se han llevado a cabo empleando cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa ORF, cuyo modelo ha usado estandarizado previamente (Palomares y col, 2004 y 2006). Considerando que la cepa WFU de *Taenia crassiceps* presenta mayor semejanza morfológica con los cisticercos de *Taenia solium*, se consideró importante evaluar la actividad de los compuestos FHL18, FHL19 y JVG40 en esta cepa.

### 7.1.1.2. Actividad cisticida de compuestos contra cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa WFU

En la tabla 7 se presentan los resultados de actividad cisticida de los compuestos evaluados contra cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa WFU. En ella se puede observar que los análogos fueron efectivos frente a esta cepa de cisticercos; es de destacar que la actividad de FHL18 fue similar a la obtenida con el SOALB, mientras que la actividad de los análogos FHL19 y JVG40 fue más baja. Se observa que la actividad de los compuestos (incluyendo la de SOALB) fue más baja en esta cepa, lo cual puede deberse a que el tamaño de los cisticercos es más grande (3-5 mm), en comparación con los cisticercos de la cepa ORF (2-3 mm). Otro factor puede ser la presencia del escólex, el cual se ha sugerido que puede tener una función especializada en la nutrición del parásito y ayudar al mismo a resistir la acción de los fármacos (Freeman R, 1962; Smyth J, 1981).

**Tabla 7.** Actividad cisticida *in vitro* de sulfóxido de albendazol (SOALB) y de análogos de albendazol sobre cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa WFU.

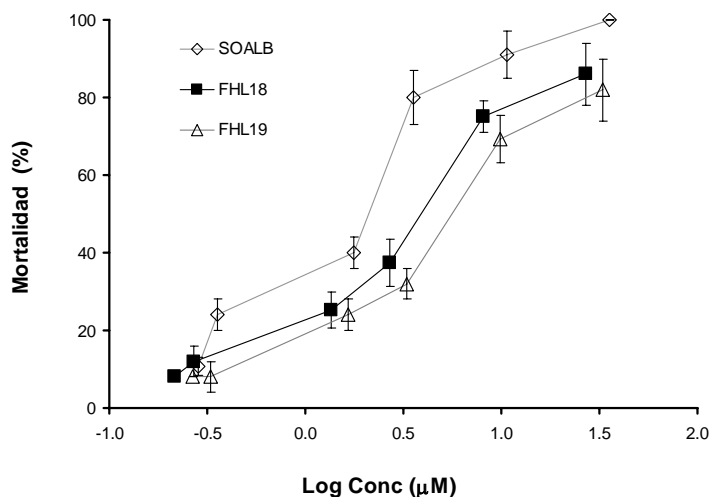
Clave	Mortalidad (%) $\pm$ DE	
	0.28 $\mu$ M	1.7 $\mu$ M
SOALB	25 $\pm$ 2.3	35 $\pm$ 2.3
FHL18	22.6 $\pm$ 2.3	26 $\pm$ 4
FHL19	9.3 $\pm$ 2.3	16.7 $\pm$ 3
JVG40	5 $\pm$ 2.3	8 $\pm$ 0

DE es Desviación estándar

Con base en estos resultados se procedió a determinar  $CE_{50}$  para los compuestos FHL18 y FHL19, empleando la cepa WFU.

### 7.1.1.3. Determinación de la $CE_{50}$ de los compuestos FHL 18 y FHL19

Las curvas concentración-respuesta de los compuestos FHL18 y FHL19, así como la de SOALB empleando cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa WFU se muestran en la figura 14. En ella se puede observar que la mortalidad máxima fue de  $86\% \pm 8$  y de  $82\% \pm 6$ , para FHL18 y FHL19, respectivamente. Los resultados de  $CE_{50}$  calculado por el método de regresión *Logit* y utilizando el programa estadístico *SPSS* versión 10, se presentan en la tabla 8. Los resultados muestran que pese a que el valor de  $CE_{50}$  del compuesto FHL18 fue mayor al del sulfóxido, los intervalos de confianza se superponen, indicando que éste compuesto es igualmente potente que el sulfóxido. En el caso del compuesto FHL19, éste fue menos potente que el SOALB. Dado que el compuesto FHL18 es el más promisorio en actividad cisticida, se decidió llevar a cabo el estudio de su eficacia *in vivo*. Estos resultados son de gran relevancia ya que existen escasos reportes relacionados con el desarrollo de nuevas moléculas con actividad antihelmíntica (Gorbert y Jones, 2008; Hoerauf, 2008; Behnke, 2008) y, en particular, no hay reportes de nuevas moléculas con actividad cisticida.



**Figura 14.** Curva concentración-respuesta de sulfóxido de albendazol (SOALB) y de los análogos activos contra cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa WFU. Cada punto representa el promedio de parásitos muertos  $\pm$  DE ( $n=3$ ).



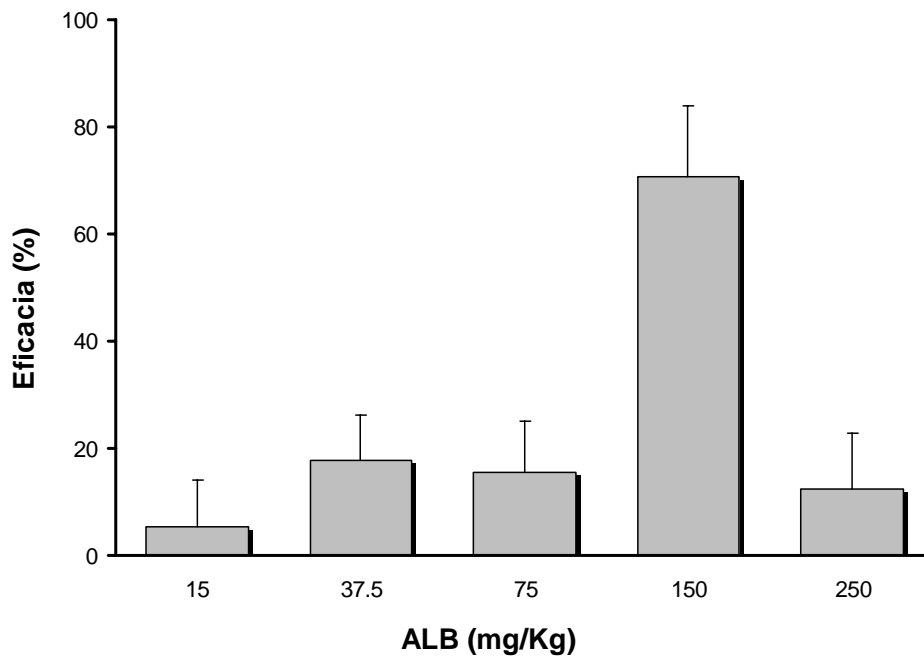
**Tabla 8.** Valores de  $CE_{50}$  *in vitro* de análogos de albendazol y de sulfóxido de albendazol (SOALB) contra cisticercos de *T. crassiceps* cepa WFU

Clave	$CE_{50}$ ( $\mu$ M)	IC 95% ( $\mu$ M)
SOALB	1.5	0.6-3.9
FHL18	3.7	2.8-5.1
FHL19	5.5	4.1-7.4

$CE_{50}$  es la concentración efectiva para matar al 50% de los parásitos,  $IC_{95\%}$  es el intervalo de confianza al 95%

### 7.1.2 Estudios *in vivo* de actividad cisticida

En la figura 15 se muestra la eficacia *in vivo* de ALB en el modelo de cisticercosis murina. En ella se observa que no existe una relación directa entre la dosis y la eficacia cisticida, por lo tanto, no fue posible determinar la dosis efectiva 50.



**Figura 15.** Eficacia *in vivo* de albendazol (ALB) sobre cisticercos de *Taenia crassiceps* de la cepa WFU. Cada barra representa la media en la eficacia de cada dosis evaluada  $\pm$  DE (n=6).

Es de hacer notar que con la dosis de humanos (15 mg/kg) se obtuvo una eficacia casi nula, lo cual podría deberse a que no hubieran alcanzado los niveles efectivos para lograr la mortalidad de los parásitos. Otro factor que podría estar relacionado con la ineficacia de esta dosis, es el tiempo de vida media del metabolito activo de ALB (el sulfóxido) es muy corto cuando se administra a ratones (de 0.4 a 3 h) (Castillo y col, 1999; García-Rodríguez y col, 2001). García y col. (2003), señalan que en ratones experimentalmente infectados con *Trichinella spiralis*, se requieren de altas dosis de este fármaco para obtener un efecto antihelmíntico (50-100 mg/Kg/día). Este factor es importante, ya que se ha encontrado que la actividad cisticida del metabolito activo del ALB es dependiente tanto del tiempo como de la concentración del fármaco (Palomares y col, 2004). Se requieren de otros estudios para explicar esta falta de correlación entre la dosis de ALB y su eficacia cisticida.

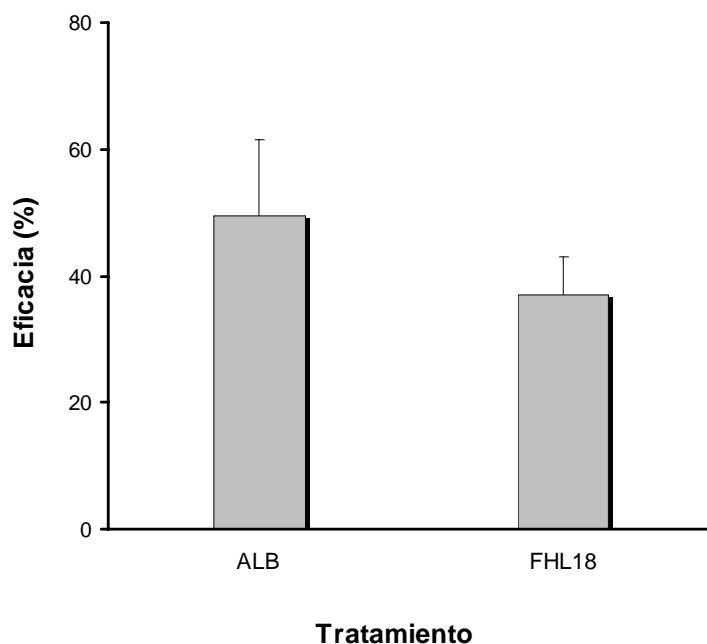
Al igual que en pacientes, el tratamiento con diferentes dosis de ALB no fue 100% efectivo. La eficacia mayor se encontró al administrar una dosis de 150 mg/Kg (71% ± 13). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Pérez-Serrano y col, (1997) los cuales reportan que al administrar una dosis de 50 mg/Kg/día por 3 meses a ratones infectados con *Echinococcus granulosus* se obtiene una eficacia del 43.7%. Asimismo, García-Rodríguez y col (2001) probaron que el éste fármaco fue efectivo contra la forma quística de *Trichinella spiralis* en ratones experimentalmente infectados. Los resultados mostraron que la reducción en la carga parasitaria fue de 25 y 40 %, con una dosis de 50 y 100 mg/Kg respectivamente.

Cabe señalar que con la dosis de 150 mg/kg, todos los ratones sobrevivieron al tratamiento y al efectuar la autopsia no se observaron alteraciones evidentes en el tracto gastrointestinal.

### 7.1.2.1. Eficacia del análogo FHL18

En la figura 16 se muestra la eficacia *in vivo* de FHL18 y de ALB después de la administración de una dosis de 216.6 mg/Kg y 150 mg/Kg, respectivamente, durante 30 días empleando el modelo de cisticercosis murina por *Taenia crassiceps*.

La eficacia del FHL18 fue del 37% y fue estadísticamente semejante a la del ALB cuya eficacia fue del 49%. Al evaluar la seguridad de esta nueva molécula, se encontró que todos los animales tratados sobrevivieron al tratamiento y no mostraron cambios en su comportamiento de alimentación. Al realizar la necropsia no se observaron alteraciones evidentes en los órganos internos. Los resultados muestran que el compuesto FHL18 podría ser un buen candidato para el tratamiento de la cisticercosis, ya que a la dosis evaluada fue seguro y presentó actividad cisticida, por lo que para evaluar su potencial uso en humanos es recomendable seguir con su evaluación para determinar sus propiedades biofarmacéuticas, así como su farmacocinética y biodisponibilidad.



**Figura 16.** Eficacia cisticida *in vivo* de albendazol (ALB) y del compuesto FHL18. Las barras representan la eficacia promedio  $\pm$  DE (n=6).

### 7.1.3. Estudios de modelado molecular

Con el propósito de identificar los requerimientos estructurales para la actividad cisticida, se llevó a cabo un estudio molecular empleando los análogos de ALB evaluados *in vitro*. Para cada molécula se realizó un análisis estructural y se relacionó con la actividad cisticida *in vitro*. En la tabla 9, se incluye la estructura de cada compuesto así como su actividad cisticida *in vitro*. Los resultados mostraron que la introducción de un grupo metilo en la posición 1, anuló completamente la actividad (compuestos FHL13 y FHL14). Cuando el átomo de hidrógeno del grupo carbamato de metilo fue reemplazado con un grupo metilo la actividad disminuyó dramáticamente, indicando que el átomo de hidrógeno en el nitrógeno exocíclico y en la posición 1 de núcleo benzimidazólico son necesarios para la actividad cisticida (compuesto JPV001). Al evaluar el efecto de los sustituyentes en la posición 5, se encontró que cuando el grupo propiltio en la posición 5 fue reemplazado con grupos voluminosos, como el [(4-nitrobenzil) oxil] carbonilo o el piperidin-1-ilcarbonilo (FHL18 y FHL19), la actividad se mantuvo y fue muy cercana a la encontrada con el SOALB. En el caso del compuesto JVG40, la presencia de un átomo de Cl en el anillo benzimidazólico disminuyó la actividad significativamente, mientras que la introducción del grupo metilaminocarbonilo suprimió la actividad del compuesto NLB24.

**Tabla 9.** Estructura y actividad cisticida *in vitro* de sulfóxido de albendazol (SOALB) y de análogos de albendazol sobre cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF.

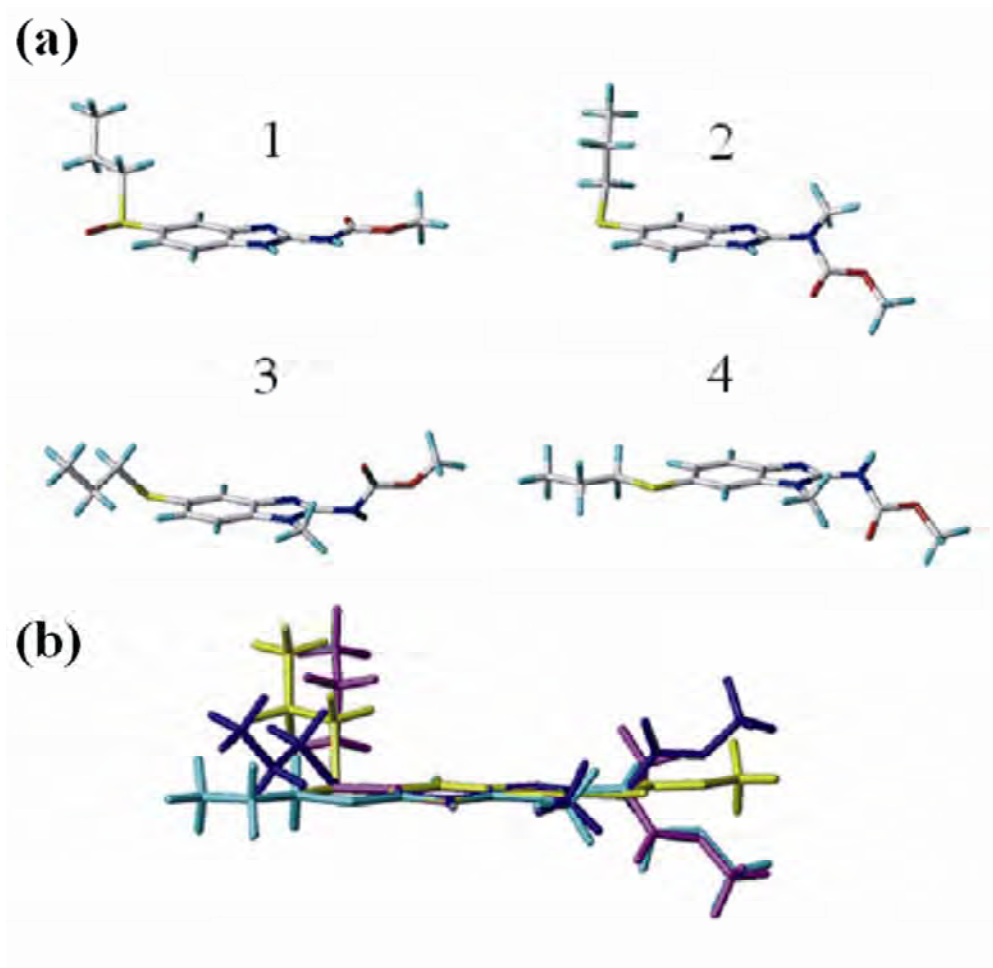
Numeración del núcleo benzimidazólico		Mortalidad (%)±DE
Clave	Estructura	
		1.7 μM
SOALB		88±7
FHL13		5±2.3
FHL14		4±0
FHL18		68±7
FHL19		62±8
NLB24		3±4.6
JPV001		3±2.3
JVG40		23±2.3

SOALB es sulfóxido de albendazol, DE es la desviación estándar.

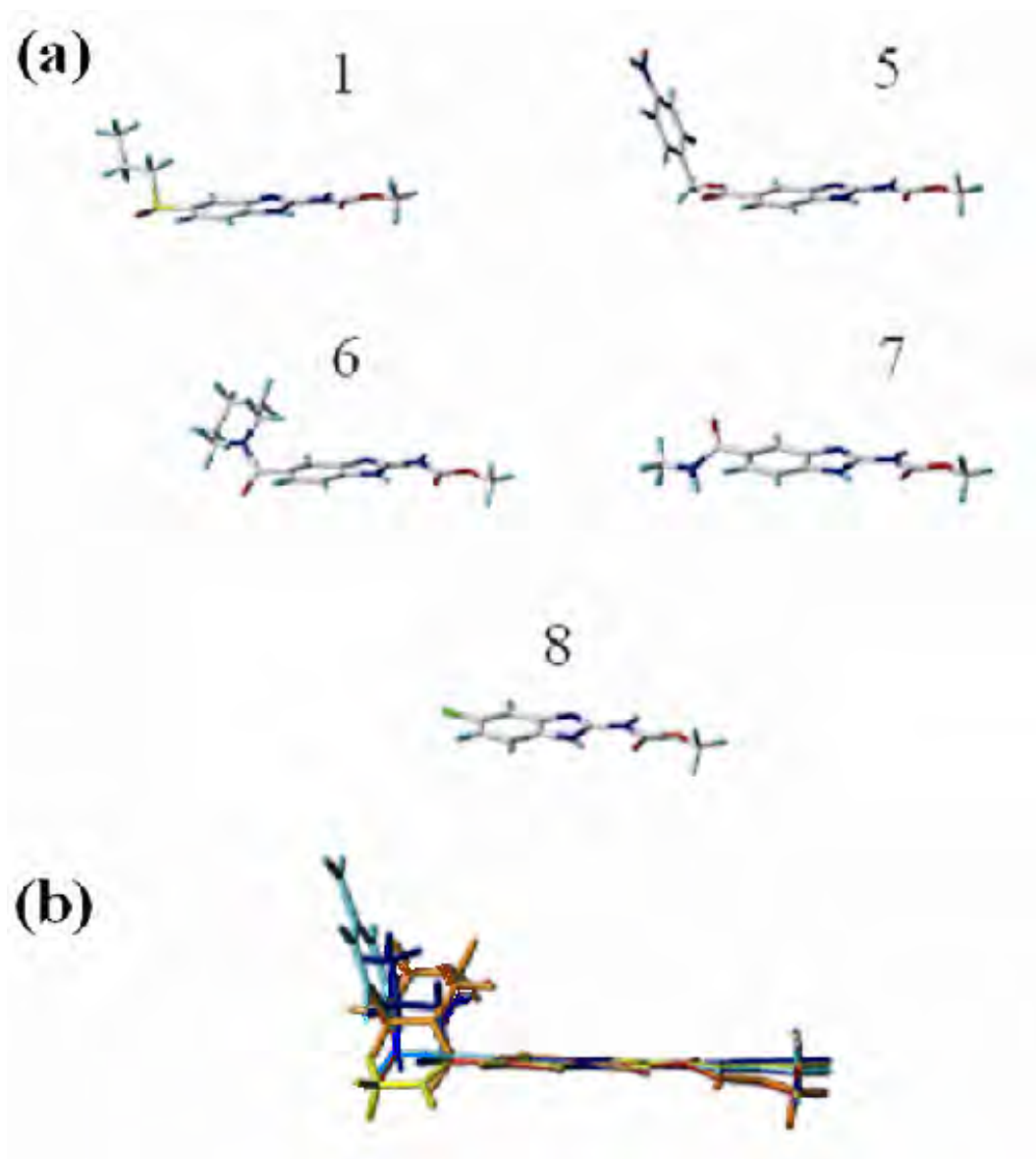
### 7.1.3.1. Análisis conformacional

Se realizó el análisis conformacional para cada compuestos utilizando el software Sybyl 7.0 (Tripos Inc., USA) considerando todos los enlaces rotables (Leach, 1991) y algunas moléculas se modificaron utilizando el método de fragmentos. Como molécula de comparación se uso el SOALB. La figura 17 presenta los conformeros de baja energía de sulfóxido de albendazol y de los compuestos JPV001, FHL13, y FHL14, cuales presentan una sustitución en la posición 1 y 2 del núcleo benzimidazólico. La figura 18 muestra los conformeros de baja energía del sulfóxido y de los compuestos FHL18, FHL19, NLB24 y JVG40, lo cuales presentan una sustitución en la posición 5 del núcleo benzimidazólico. Estas figuras proveen evidencia visual de las similitudes y diferencias estructurales entre las moléculas estudiadas.

Se puede observar que la introducción del grupo metilo en la posición 1 ó 2 del núcleo (JPV001, FHL13 y FHL14) (Figura 17a) afecta la planaridad del grupo carbamato (Figura 17b). Esta característica es importante, ya que estudios teóricos han mostrado que la conformación planar del grupo carbamato del sulfóxido facilita su acomodo dentro del sitio de unión en un modelo teórico de  $\beta$ -tubulina de *Haemonchus contortus* (Robinson y col, 2004). Asimismo, se observó que la actividad cisticida se mantiene cuando los grupos en la posición 5 pueden adoptar una conformación ortogonal al anillo benzimidazólico (McCracken y Lipkowitz, 1990), como en el caso de los grupos [(4-nitrobenzil)oxi]carbonilo y el piperidin-1-ilcarbonilo presentes en FHL18 y FHL19, respectivamente (Figura 18a). En el caso del compuesto JVG40 (Figura 18a), al presentar un átomo de cloro en la posición 5, aunque no adopta una posición ortogonal al anillo benzimidazólico, podría acomodarse dentro del sitio activo de la  $\beta$ -tubulina. Esta hipótesis se basa en el hecho de que este compuesto presentó una modesta actividad cisticida.



**Figura 17.** Confórmeros de baja energía de sulfóxido de albendazol (1), JPV001 (2), FHL13 (3) y FHL14 (4). (a) Compuestos modelados. (b) Superposición de 1 (amarillo), 2 (azul marino), 3 (azul claro) y 4 (morado). El grupo metil-carbamato es planar en 1, mientras que el grupo carbamato en los compuestos 2-4 está fuera del plano debido al efecto alostérico de grupo metilo que se colocó en la posición 1 ó 2.



**Figura 18.** Conformeros de baja energía de sulfóxido de albendazol (1), FHL18 (5), FHL19 (6), NLB24 (7) y JVG40 (8). (a) Compuestos modelados. (b) Superposición de 1 (azul), 5 (azul claro), 6 (naranja), 7 (amarillo) y 8 (violeta). En todas la moléculas, excepto en la 7 y 8, los sustituyentes en la posición 5 fueron ortogonales al anillo benzimidazólico.



Con la finalidad de identificar las características moleculares que tienen influencia sobre la actividad se calcularon los principales descriptores moleculares de cada compuesto. Los descriptores moleculares calculados fueron el calor de formación, volumen molecular, coeficiente de partición octanol/agua, potencial de ionización, momento dipolo, superficie de área polar, orbital molecular de alta energía y el orbital molecular de baja energía. Para ello, se utilizó el software Spartan 02 (Wave function, Irvine, CA, USA). Los descriptores se correlacionaron con la actividad *in vitro* usando el módulo de relación cuantitativa de estructura-actividad denominado QSAR en Sybyl V. 7.3.

Estudios previos realizados por McCracken y Lipkowitz (1990) encontraron que la actividad helmíntica de algunos derivados benzimidazólicos, entre ellos el ALB, muestra una buena correlación con el momento dipolo. En contraste, en el presente trabajo se encontró una escasa correlación de la actividad cisticida con el descriptor del orbital molecular de alta energía ( $r=0.399$ ). Esto puede deberse a las diferencias en los estudios, ya que McCracken y Lipkowitz usaron diferentes dosis de compuestos benzimidazólicos para evaluar la actividad antihelmíntica y en el presente estudio se usó una dosis fija de todos los compuestos. Otro factor podría ser la diferencia entre la especie empleada en la evaluación biológica, ya que McCracken y Lipkowitz utilizaron *Hymenolepis* y en el presente estudio se utilizaron cisticercos de *Taenia*. Por lo que, sería necesario realizar otros estudios para encontrar los descriptores moleculares que tienen influencia en la actividad cisticida.

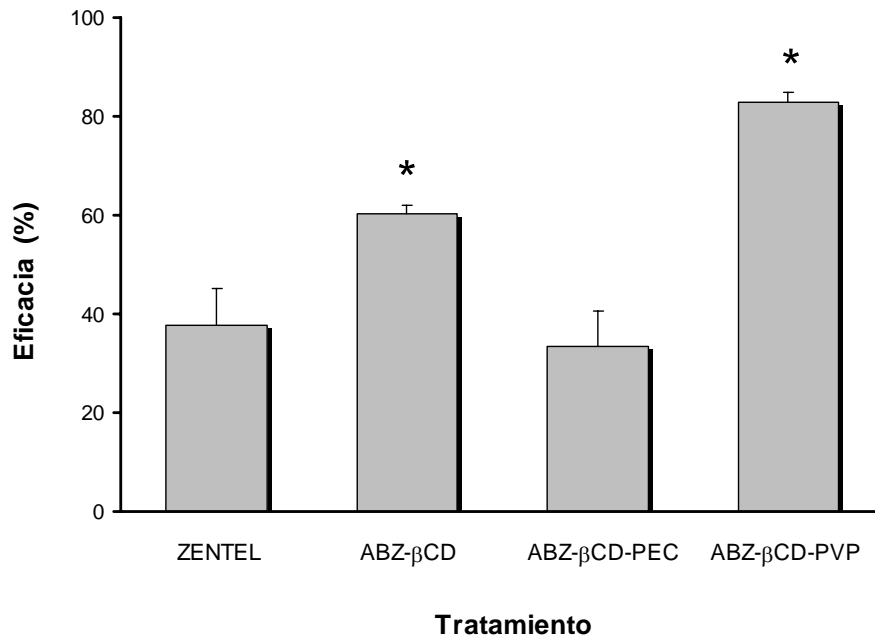
Los resultados obtenidos permitieron identificar las características moleculares específicas para que un derivado benzimidazólico presente eficacia cisticida. Se requiere que la molécula presente un átomo de hidrógeno en la posición 1, un grupo carbamato de metilo en la posición 2 del núcleo benzimidazólico y un sustituyente voluminoso en la posición 5, el cual debe ser ortogonal al anillo.

Considerando que la investigación de nuevas moléculas con actividad helmíntica es de poco interés, los resultados de este proyecto aportan información valiosa en relación a las características químicas de moléculas con potencial cisticida. Esta información serviría como base para realizar una síntesis dirigida de nuevas moléculas.

## 7.2 Parte II. Evaluación de formulaciones de albendazol con $\beta$ -ciclodextrina y polímeros hidrosolubles

### 7.2.1 Evaluación de la actividad cisticida *in vivo*

La Figura 19 muestra los resultados de eficacia cisticida de las formulaciones evaluadas. En todos los tratamientos se observó una disminución significativa de la carga parasitaria con respecto al grupo control. La eficacia promedio fue de: 33.3 %, 38%, 60.3% y 83%, para las formulaciones conteniendo ALB- $\beta$ CD-PEC, Zentel, ALB- $\beta$ CD y ALB- $\beta$ CD-PVP, respectivamente. Dado que no existen reportes de la eficacia *in vivo* de ALB en cisticercos de *Taenia crassiceps* el presente estudio demuestra que la dosis de 150 mg/Kg es adecuada para evaluar la eficacia de éste fármaco contra este tipo de metacésto.



**Figure 19.** Eficacia cisticida de las diferentes formulaciones bajo estudio. Zentel, albendazol- $\beta$ -ciclodextrina (ALB- $\beta$ CD), albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-pectina (ALB- $\beta$ CD-PEC) y albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-polivinilpirrolidona (ALB- $\beta$ CD-PVP). Cada barra representa el valor promedio  $\pm$  DS (n=6). \* P < 0.05 contra el grupo tratado con Zentel.

Este es el primer estudio en el cual se evalúa eficacia de una formulación binaria de ALB con  $\beta$ -ciclodextrina. La mayoría de los estudios se ha enfocado a la evaluación de formulaciones de éste fármaco con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina debido a que ésta última incrementa la solubilidad del fármaco en mayor proporción que la  $\beta$ -ciclodextrina (Castillo y col, 1999). García y col. (2003) evaluaron una formulación líquida de ALB con hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina (1:1) a una dosis de 100 mg/Kg en ratones infectados con quistes de *Trichinella spiralis*, encontrando que la eficacia se incrementó 2.9 veces en comparación con una dispersión líquida del fármaco en carboximetilcelulosa (de 33% a 97.5%). Asimismo, Kalaiselvan y col. (2007) evaluaron la eficacia de una dispersión de fármaco con polivinilpirrolidona (1:1) en el mismo parásito, encontrando que la eficacia se incrementó 11 veces en comparación con una dispersión del fármaco en carboximetilcelulosa. Los resultados del presente trabajo muestran que la formulación binaria de ALB- $\beta$ -ciclodextrina (1:1) incrementó la eficacia 1.8 veces en relación con la formulación comercial. Pese a que este incremento es menor al obtenido con las formulaciones conteniendo hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina ó polivinilpirrolidona, este fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) al producto de referencia.

Estos resultados muestran que la formulación binaria de ALB con  $\beta$ -ciclodextrina podría ser una buena opción para incrementar la eficacia cisticida de éste fármaco.

La formulación ternaria de ALB- $\beta$ CD-PEC, presentó una eficacia semejante a la encontrada con Zentel, lo cual indica que la incorporación del polímero disminuyó la eficacia 1.5 veces (de 60 % a 38%) en relación a la formulación binaria. Una de las razones que podría explicar estos resultados es que la pectina tiene la capacidad de formar geles *in vivo*, proceso que depende del pH del medio entre otros factores. Ello afecta la liberación del fármaco y en consecuencia su eficacia (Liu y col, 2003). Por lo

que sería necesario llevar a cabo otros con este sistema ternario, tales como la evaluación de la liberación del fármaco *in vitro* a diferentes condiciones de pH ó bien realizar un estudio *in vivo* en conejos para observar el posible proceso de gelificación en el tracto gastrointestinal.

En relación al sistema ternario ALB- $\beta$ CD-PVP, esta formulación presentó la mejor eficacia cisticida, siendo 2.5 veces mayor a la obtenida con la suspensión comercial y 1.38 veces mayor a de la formulación binaria. Ello podría deberse al incremento en la solubilidad del sistema fármaco- $\beta$ -ciclodextrina por la inclusión del polímero hidrosoluble y por ende en la disolución del fármaco (Castillo, 2009), ya que se ha documentado que la disolución del fármaco esta directamente relacionada con la cantidad de fármaco absorbido la cual determina la concentración a nivel sistémico y su eficacia en infecciones sistémicas (Kalaiselvan y col, 2007).

Los resultados del presente estudio son semejantes a los previamente reportados con una formulación ternaria de ALB-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina-ácido tartárico (1:1:1, molar/molar/molar) contra *Trichinella spiralis*, cuya eficacia fue del 85% (Kalaiselvan y col, 2007). La ventaja de la formulación ternaria con  $\beta$ -ciclodextrina y PVP, es que esta última sería más económica ya que el costo de la  $\beta$ -ciclodextrina es mucho menor que la de la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina. Asimismo se ha encontrado que algunas  $\beta$ -ciclodextrinas sustituidas en particular la hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina alteran la permeabilidad de la membrana (Rigter y col, 2004; Carrier y col, 2007), lo cual puede dar lugar a efectos adversos tales como la aparición de diarrea. Ello es un factor limitante para su uso prolongado como es el caso de tratamiento de infecciones sistémicas, donde se requieren de altas dosis de fármaco por un largo periodo de tiempo. Es de hacer notar que todas las formulaciones bajo estudio fueron bien toleradas por los

animales y no se observaron anomalías en la conducta o en el consumo de alimento. Los animales tampoco presentaron diarrea durante el periodo de tratamiento

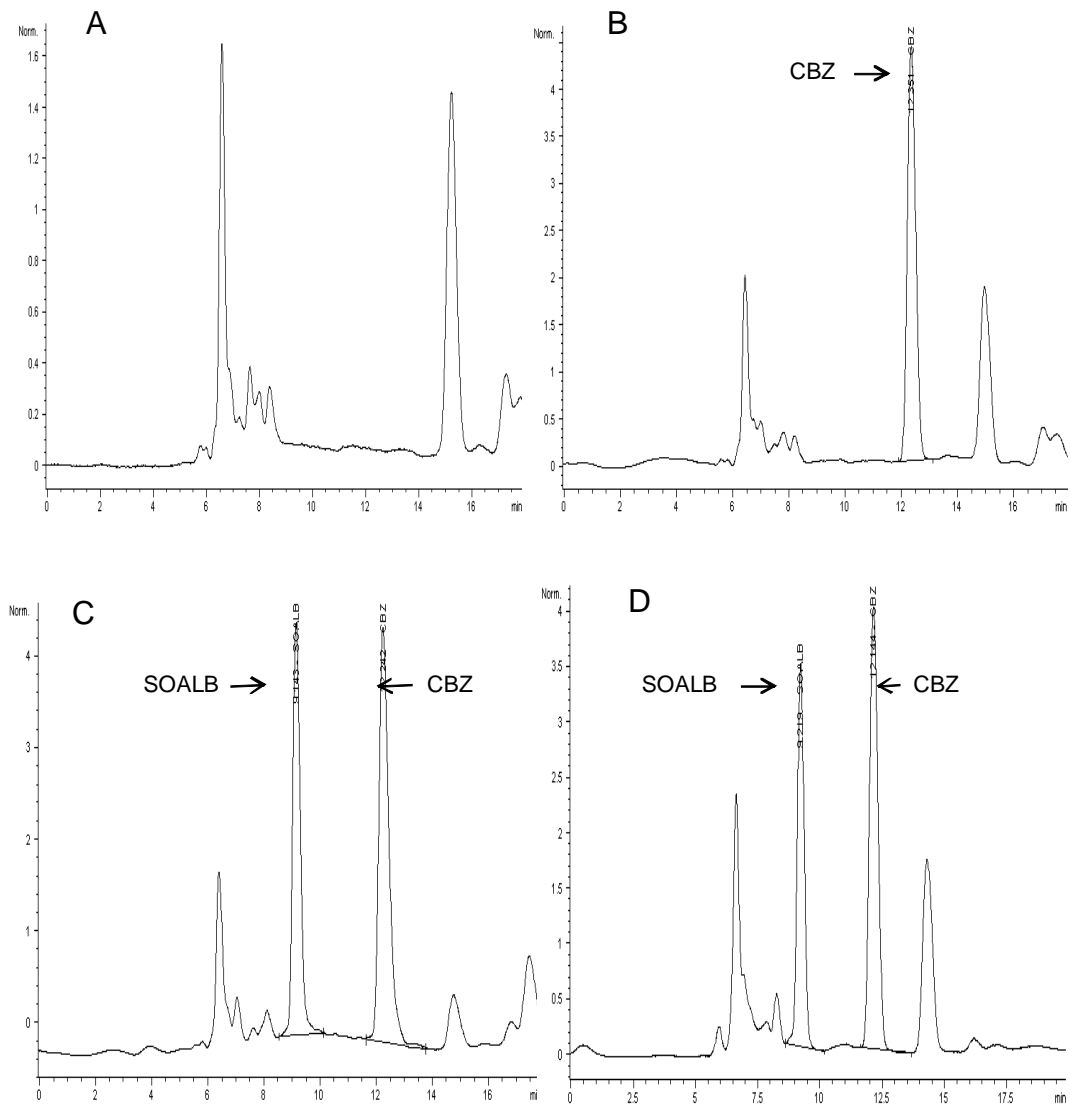
## **7.2.2 Estudio de biodisponibilidad de formulaciones de albendazol con $\beta$ -ciclodextrina y polímeros hidrosolubles**

### **7.2.2.1 Validación del método analítico para cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma de rata**

La validación del método analítico para la cuantificación de SOALB desarrollado demostró que este es confiable para ser utilizado en los estudios de biodisponibilidad. Los resultados de la validación se muestran a continuación.

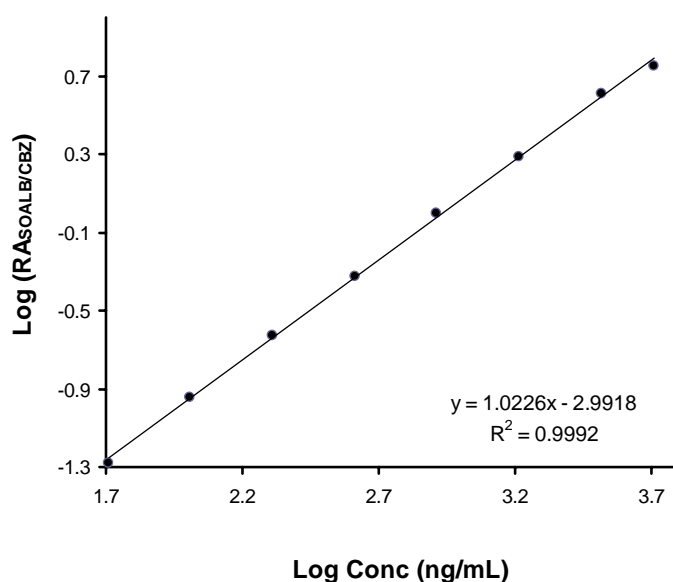
*Selectividad.* En la figura 20A y 20B muestran los cromatogramas correspondientes a plasma de rata sin fármaco y sin estándar interno, y una muestra de plasma adicionada con carbamazepina. Las figuras 20C y 20D muestran los cromatogramas correspondientes a plasma adicionado con 400 ng/mL de sulfóxido de albendazol y 200 ng de carbamazepina, y una muestra de plasma obtenido de una rata después de 4 horas de la administración con albendazol (10 mg/Kg) adicionada con carbamazepina. Los tiempos de retención para el SOALB y para la carbamazepina fueron de 9.27 min y 12.41 min, respectivamente. Dado que la matriz biológica (plasma de rata) no interfirió en la detección y cuantificación del SOALB o del estándar interno, se establece que el método es selectivo para esta molécula.

*Límite de detección y cuantificación.* El límite de cuantificación fue de 50 ng/mL. El límite de detección fue de 25 ng/mL, considerado como la concentración cuya señal fue 5 veces la señal de ruido.



**Figura 20.** Cromatogramas representativos de: (A) blanco de plasma (B) plasma adicionado con carbamazepina (CBZ), (C) plasma adicionado con 400 ng/mL de sulfóxido de albendazol (SOALB) y carbamazepina (CBZ) y (D) muestra de plasma de rata después de 4 horas de la administración de albendazol (10 mg/Kg) y adicionado con carbamazepina (CBZ).

*Linealidad.* El mejor modelo de ajuste se encontró al relacionar el logaritmo de la relación de alturas (altura de SOALB/altura de carbamazepina) versus el logaritmo de la concentración. La figura 21 muestra la gráfica promedio de las 3 curvas evaluadas y en la tabla 10 se presentan los valores de la pendiente, ordenada al origen y el coeficiente de correlación, empleando este modelo. Dado que el coeficiente de correlación fue mayor a 0.99 en las 3 curvas y los valores de coeficiente de variación del intercepto y la pendiente fueron menores al 3%, el método se consideró lineal en el rango de concentraciones de 50 a 5000 ng/mL.



**Figura 21.** Linealidad del método analítico. RA<sub>SOALB/CBZ</sub> es la relación de altura de sulfóxido de albendazol (SOALB) y carbamazepina (CBZ).

**Tabla 10.** Valores obtenidos de la regresión Log de la relación de alturas de sulfóxido de albendazol y carbamazepina versus Log concentración de sulfóxido de albendazol.

Curva	r	m	b
1	0.9982	0.9685	-2.8433
2	0.9982	1.0194	-2.9303
3	0.9987	0.9944	-2.9370
<b>Promedio</b>	0.9984	0.9941	-2.9035
<b>DE</b>	0.00028	0.0254	0.0522
<b>% CV</b>	<b>0.028</b>	<b>2.56</b>	<b>1.80</b>

DE es desviación estándar; CV es coeficiente de variación; r es coeficiente de correlación; m es la pendiente y b es ordenada al origen.



*Exactitud y precisión.* Los resultados de exactitud y precisión del método se muestran en la tabla 11. En ella se puede observar que la desviación estándar absoluta con respecto al valor nominal fue menor al 15% en las diferentes concentraciones evaluadas, lo que documenta la exactitud del método. Asimismo, se observa que el coeficiente de variación en cada uno de los niveles de concentración evaluados fue menor al 10 % por lo que el método se consideró preciso.

**Tabla 11.** Exactitud y precisión del método analítico.

Concentración Teórica (ng/mL)	Concentración Recuperada (ng/mL)	DE <sub>abs</sub> (%)
<b>75</b>	81.82	9.10
	78.06	4.08
	71.57	4.57
	78.31	4.41
	77.08	2.77
	Promedio =	77.37
DE=	3.710	
CV (%)=	<b>4.79</b>	
<b>1000</b>	928.52	7.14
	861.14	10.88
	1006.16	0.61
	856.49	11.35
	943.90	5.61
	Promedio=	919.24
DE=	62.37	
CV (%)=	<b>6.79</b>	
<b>4000</b>	3903.34	2.41
	4409.60	10.24
	4493.45	4.83
	4409.60	10.24
	4403.54	10.09
	Promedio=	4323.91
DE=	238.04	
CV (%)=	<b>5.50</b>	

DE<sub>abs</sub> es la desviación estándar absoluta, CV es el coeficiente de variación

Recobro absoluto

La tabla 12 muestra los valores promedio de recobro absoluto obtenidos a partir de las tres curvas de calibración. En ella se puede observar que el recobro promedio fue de  $103.59\% \pm 2.31$  y fue reproducible en todos los niveles de concentración evaluados.

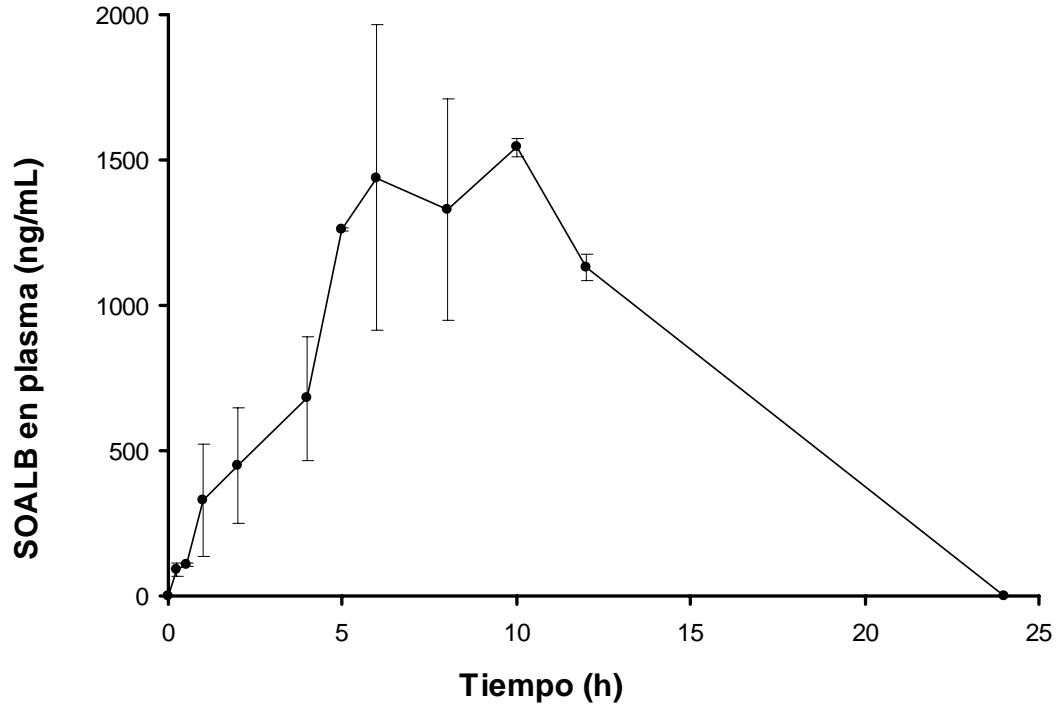
**Tabla 12.** Recobro absoluto del método analítico para cuantificar sulfóxido de albendazol (SOALB)

Concentración de SOALB (ng/mL)	Recobro absoluto promedio n=3 (%)*
50	103.4
100	106.9
200	105.9
400	105.9
800	102.1
1600	100.9
3200	102.3
5000	101.4
<b>Promedio</b>	<b>103.59</b>
<b>DE</b>	<b>2.31</b>
<b>CV (%)</b>	<b>2.23</b>

\*valores promedio de 3 curvas. DE es la desviación estándar y CV es el coeficiente de variación

### 7.2.2.2 Estudio piloto de biodisponibilidad de albendazol en rata

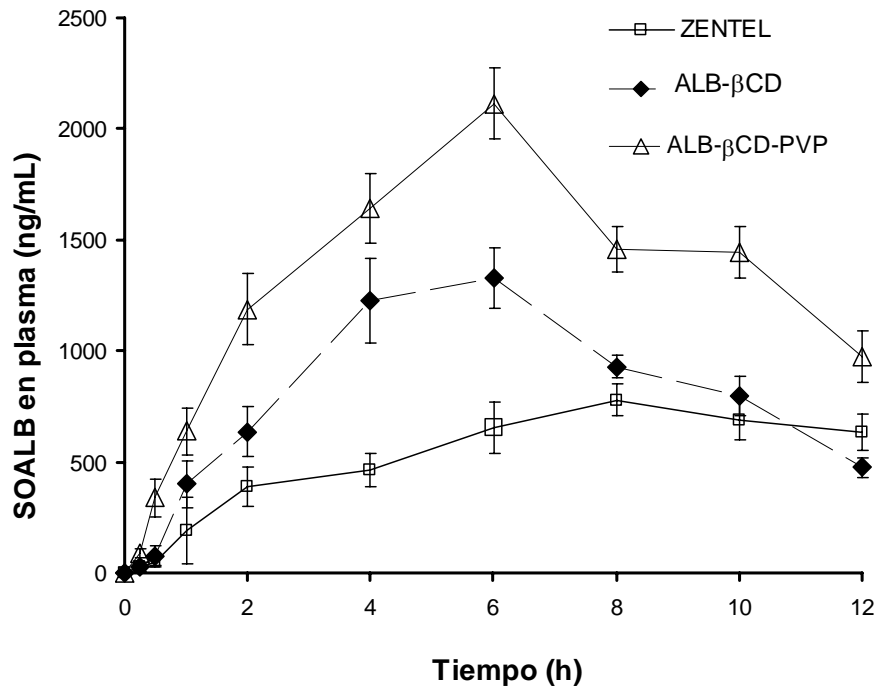
De acuerdo a lo descrito en la sección 6.2.3.2 el propósito de este estudio era seleccionar las condiciones (dosis y tiempos de muestreo) para llevar a cabo el estudio de biodisponibilidad de las formulaciones conteniendo ALB. En la figura 22 se presenta el perfil de concentración plasmática vs tiempo, después de la administración del fármaco a una dosis de 15 mg/Kg a ratas. En ella se observó la presencia de un doble pico (6 h y 10 h). Este comportamiento podría estar relacionado al tamaño de la muestra, ya que en este estudio sólo se incluyeron 2 animales por tiempo de muestreo. Todas las concentraciones se encontraron dentro del rango de la curva de calibración. Dado que se esperaba que los niveles de metabolito activo se incrementaran con la formulación de ALB conteniendo la  $\beta$ -ciclodextrina y la PVP se decidió utilizar una dosis de 10 mg/Kg para el estudio final. De igual modo dado que a las 24 horas postadministración no se detectaron niveles de sulfóxido de albendazol, se resolvió acortar el tiempo a 12 horas y utilizar un número mayor de animales para los demás tiempos de muestreo.



**Figura 22.** Niveles plasmáticos de sulfóxido de albendazol (SOALB) versus tiempo (h) después de la administración oral de albendazol (15 mg/Kg). Cada punto representa la media  $\pm$  DE (n=2).

7.2.2.3 Estudio de biodisponibilidad de nuevas formulaciones de albendazol

La figura 23 muestra los perfiles plasmáticos de SOALB versus el tiempo después de la administración de las diferentes formulaciones conteniendo ALB. Los parámetros farmacocinéticos se presentan en la tabla 13.



**Figura 23.** Niveles plasmáticos de sulfóxido de albendazol (SOALB) versus tiempo (h) después de la administración de la formulación de albendazol-β-ciclodextrina (ALB-βCD), albendazol-β-ciclodextrina-polivinilpirrolidona (ALB-βCD-PVP) y de Zentel. Se administró una dosis oral única de albendazol equivalente a 10 mg/Kg. Cada punto representa la media ± EE (n=6).

**Tabla 13.** Parámetros farmacocinéticos obtenidos después de la administración de las formulaciones de albendazol (ALB)(10 mg/Kg).

Formulación	Parámetros farmacocinéticos (media ± EE) ( n=6)		
	Cmax (ng/mL)	Tmax (h)	AUC <sub>0-12</sub> (ng/h/mL <sup>-1</sup> )
Zentel®	859±73.12 <sup>b</sup>	8.33±0.81 <sup>b</sup>	6855±1035.4 <sup>b</sup>
ALB-βCD	1507±94.88 <sup>a</sup>	6 ± 0 <sup>a</sup>	10784±1040 <sup>a</sup>
ALB-βCD-PVP	1977±189.87 <sup>a, b</sup>	6.33±0.3 <sup>a, b</sup>	15708±1980 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> P<0.05 con respecto al grupo de Zentel. <sup>b</sup> P<0.05 con respecto a ALB-βCD. EE es error estándar.

### **Efecto de la $\beta$ -ciclodextrina sobre la biodisponibilidad de albendazol**

Se ha reportado que la constante de estabilidad aparente ( $K_c$ ) del ALB con la  $\beta$ -ciclodextrina es de  $68.9 \text{ M}^{-1}$  en medio acuoso, lo que indica una débil asociación del fármaco en este complejo (Castillo y col, 1999). Es por ello que no se esperaba un incremento significativo en la biodisponibilidad de este fármaco en el sistema binario. Al analizar los datos de la tabla 13 se encontró que contrariamente a lo previsto, los valores de  $C_{max}$  y AUC fueron significativamente mayores a los de Zentel ( $P < 0.05$ ), mientras que el tiempo para alcanzar la concentración máxima fue más corto. El incremento en  $C_{max}$  y AUC fue de 1.75 veces y 1.57 veces, respectivamente. El aumento en la velocidad de absorción y en la cantidad absorbida a partir del sistema binario podría estar asociado a un incremento del fármaco disuelto en el tracto gastrointestinal ya que se ha demostrado que el principal mecanismo mediante el cual las ciclodextrinas incrementan la absorción es incrementando la solubilidad del fármaco (Carrier y col. 2007). Los resultados del presente estudio son semejantes a los obtenidos con una formulación conteniendo hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina a una dosis de 50 mg/Kg (Castillo y col., 1999) con la que el incremento en la  $C_{max}$  fue de 1.68 veces y en AUC de 1.39 veces con respecto a los obtenidos al administrar una suspensión de ALB en carboximetilcelosa. De forma similar, García y col (2003) encontraron un aumento semejante en la biodisponibilidad de este fármaco en ratones a los cuales se les administró una dosis de 100 mg/Kg de una formulación líquida conteniendo ALB y hidroxipropil-ciclodextrina al 20% (peso/volumen) y ácido clorhídrico 0.2 M. Los resultados del presente trabajo muestran que la  $\beta$ -ciclodextrina también es una buena opción para incrementar la biodisponibilidad de albendazol.

### **Efecto de la polivinilpirrolidona y la $\beta$ -ciclodextrina sobre la biodisponibilidad de albendazol**

Al analizar los resultados de la formulación ternaria ALB- $\beta$ CD-PVP se encontró que la absorción de fármaco se incrementó significativamente, en relación a las demás formulaciones. Los valores de  $C_{max}$  y AUC de la formulación ternaria fueron 2.3 veces más altos en relación a los obtenidos con Zentel, mientras que el  $t_{max}$  fue menor. De igual manera la formulación ternaria presentó valores de  $C_{max}$  y AUC 1.3 veces y 1.45 veces más altos que los obtenidos con la formulación binaria. El incremento en biodisponibilidad fue mayor con el uso de ambos excipientes en la formulación: la polivinilpirrolidona y la  $\beta$ -ciclodextrina, lo que podría deberse a una interacción positiva de éstos sobre la biodisponibilidad del fármaco. Otras opciones que permitirían explicar éste incremento son: a) la polivinilpirrolidona mejoró la capacidad solubilizante de la  $\beta$ -ciclodextrina ya que se ha encontrado que la incorporación de bajas cantidades (de 3 a 10%) de este polímero a soluciones acuosas con  $\beta$ -ciclodextrina, incrementa su solubilidad y su habilidad complejante (Loftsson y col, 1998). b) la polivinilpirrolidona modificó la permeabilidad de la membrana gastrointestinal incrementando el proceso de partición de fármaco a través de la barrera intestinal. En un estudio de permeabilidad en células Caco-2 realizado por Saha y col. (2000), se encontró que la polivinilpirrolidona (1%) incrementó el flujo de un derivado imidazólico en un 40%-65 a través de la monocapa de células, mejorando su coeficiente de partición. c) La polivinilpirrolidona mejoró la solubilidad del albendazol que no se encuentra incluido en la ciclodextrina. Este efecto ha sido observado por Torrado y col. (1996), los cuales mostraron que la velocidad de disolución de albendazol y su coeficiente de solubilidad se incrementó cuando el fármaco fue mezclado con polivinilpirrolidona. Este incremento en

solubilidad se atribuye a que la presencia del polímero disminuye la forma cristalina y aumenta la fracción amorfa del fármaco.

Estos resultados están en acuerdo con previos estudios, los cuales muestran el efecto positivo de la adición de polivinilpirrolidona sobre el efecto complejante y la habilidad solubilizante de la  $\beta$ -ciclodextrina como se observó con sistemas ternarios como naproxeno- $\beta$ -ciclodextrina-polivinilpirrolidona y vinpocetina- $\beta$ -ciclodextrina-polivinilpirrolidona (Valero y col., 2006; Ribeiro y col., 2003).

Con base en los resultados encontrados, se pone de manifiesto que la formulación binaria de albendazol- $\beta$ -ciclodextrina y la formulación ternaria de ALB- $\beta$ CD-PVP incrementan la biodisponibilidad y eficacia de ALB, sin embargo, considerando el efecto sinérgico del polímero en la formulación binaria, la formulación ternaria sería más promisoría para continuar con su evaluación en humanos.

#### **7.2.2.4 Relación del efecto con niveles plasmáticos**

Se ha demostrado que la actividad antihelmíntica de albendazol depende no sólo de su unión a la  $\beta$ -tubulina del parásito, sino también a la habilidad para alcanzar concentraciones suficientemente altas y sostenidas en el sitio en el que se localiza el parásito (Lancey, 1988; Truong y col., 2008).

Existen reportes en la literatura indicando que existe una relación entre los niveles plasmáticos de sulfóxido de albendazol y el efecto antihelmíntico de ALB en las especies de *Trichinella spiralis* y *Echinococcus granulosus* (Cassulli y col, 2006; Kalaiselvan y col, 2007). Asimismo, García y col. (2003) reportan que un incremento en  $C_{max}$  de 1.64 veces en los niveles de sulfóxido de albendazol, logra incrementar la eficacia de albendazol de 19.9% a 55.1% para la forma enquistada de *Trichinella*



*spiralis*, mientras que un aumento en C<sub>max</sub> de 2.36 veces logra incrementar la eficacia de 33% a 97.5%.

En el caso de cisticercos de *Taenia* a pesar de que hemos descrito que la actividad cisticida *in vitro* de albendazol depende de la concentración y del tiempo de exposición del fármaco frente al parásito (Palomares y col, 2004), este es el primer reporte que muestra que existe una relación entre los niveles plasmáticos y la eficacia cisticida. Dado que a la fecha no se ha establecido la concentración mínima efectiva de ALB en pacientes con neurocisticercosis, los resultados del presente trabajo confirman la importancia de continuar con la búsqueda de esta información lo cual apoyaría a la optimización de la terapia cisticida.

## 8. Conclusiones

1. Se identificó una nueva molécula (FHL18) con actividad cisticida semejante a la del sulfóxido de albendazol.
2. Se encontró una nueva formulación de albendazol (albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-polivinilpirrolidona) más efectiva y con mayor biodisponibilidad que una suspensión comercial.
3. Se establecieron los requerimientos estructurales básicos para que una molécula presente actividad cisticida.

Considerando que el compuesto FHL18 y la formulación de albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-polivinilpirrolidona podrían ser nuevas alternativas para incrementar la eficacia terapéutica de albendazol se recomienda continuar con su evaluación en humanos.

## 9. Perspectivas

- 1) Continuar con la evaluación del compuesto FHL18, determinando las propiedades biofarmacéuticas y la farmacocinética de esta molécula.
- 2) Determinar la biodisponibilidad de la formulación albendazol- $\beta$ -ciclodextrina-polivinilpirrolidona en un pequeño grupo de voluntarios sanos para caracterizar su comportamiento y explorar su utilidad clínica.

Con estos estudios se permitirá documentar si estas dos nuevas alternativas pueden ser seguras y eficaces en el tratamiento de la cisticercosis en humanos.

## 10. Bibliografía

- Alarcón, F. (2006). Neurocisticercosis: etiopatogenia, manifestaciones clínicas, diagnóstico y tratamiento. *Revista de Neurología*, 43, S93-S100.
- Albers, E., Muller, B.W. (1995). Cyclodextrin derivatives in pharmaceuticals. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 12, 311-337.
- Ammar, H.O., Salama, H.A., Ghorab, M., Mahmoud, A.A. (2006). Formulation and biological evaluation of glimepiride-cyclodextrin-polymer systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 309, 129-138.
- BASF (2007). Soluble Kollidon grades. Soluble polyvinylpyrrolidone for the pharmaceutical Industry. Technical information. Recuperado el 6 de enero de 2009, de: <http://www.pharma-solutions.basf.com/products.aspx?PRD=30034974>
- Behnke, J.M., Buttle, D.J., Stepek, G., Lowe, A., Duce, I.R. (2008). Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. *Parasites & Vectors*, 1, 1-29.
- Bennett, A., Guyatt, H. (2000). Reducing intestinal nematode infection: efficacy of albendazole and mebendazole. *Parasitology Today*, 16, 71-74.
- Bigucci, F., Luppi, B., Cerchiara, T., Sorrenti, M., Bettinetti, G., Rodríguez, L., Zecchi, V. (2008). Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 35, 435-441.
- Burnette, L.W. (1962). A review of the physiological properties of PVP. *Proceeding of the Scientific Section of the Toilet Goods Association*, 38, 1-4.
- Carrier, R., Miller, L., Ahmed, I. (2007). The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *Journal of Controlled Release*, 123, 78-99.
- Castillo, J., Palomo-Canales, J., García, J. (1999). Preparation and characterization of albendazole  $\beta$ -cyclodextrin complexes. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 25, 1241-1248.
- Castillo, D. (2009). *Estudio in vivo-in vitro de formulaciones conteniendo albendazol- $\beta$ -ciclodextrina y promotores de la absorción*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Casulli, A., Gómez, M.A., Gallinella, B. (2006). 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin improves the effectiveness of albendazole against encapsulated larvae of *Trichinella spiralis* in a murine model. *Journal of Antimicrobial and Chemotherapy*, 58, 886-90.

- Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables (2007). Albendazol. Secretaria de Salubridad y Asistencia. Recuperado el 14 de abril del 2009 de: [http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi\\_2k8/prods/PRODS/Albendazol.html](http://www.facmed.unam.mx/bmnd/gi_2k8/prods/PRODS/Albendazol.html)
- Ceballos, L., Elissondo, C., Moreno, L., Dopchiz, M., Sánchez, S., Denegri, G., Álvarez, L., Lanusse, C. (2008). Albendazole treatment in cystic echinococcosis: pharmacokinetics and clinical efficacy of two different aqueous formulations. *Parasitology Research*, 103, 355-362.
- Chai, J., Menghebat, J., Deyu, S., Bin, L., Jincao, S., Chen, F., Xiong, L., Yiding, M., Xiuling, W., Dolikun, Guliber, Yanchun, W., Fanghua, G., Shuhua, X. (2004). Observations on efficacy of albendazole emulsion in 264 cases of hepatic cystic echinococcosis. *Parasitology International*, 53, 3-10.
- Chernin, J. (1975). The growth of the metacestodes of *Taenia crassiceps* in white mice. *Journal of Helminthology*, 49, 297-300.
- Chernin, J. (1977). Aspects of the humoral response of laboratory white mice infected with the metacestodes of *Taenia crassiceps*. *Journal of Helminthology*, 51, 137-142.
- Daniel-Mwambete, K., Torrado, S., Cuesta-Bandera, C. (2004). The effect of solubilization on the bioavailability of three benzimidazole carbamate drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 272, 29-36.
- de Silva, N., Guyatt, H., Bundy, D. (1997). Anthelmintics. A comparative review of their clinical pharmacology. *Drugs*, 53, 769-788.
- Del Brutto, O.H. (2005). Neurocysticercosis: actualización en diagnóstico y tratamiento. *Neurología*, 20, 412-418
- Del Brutto, O.H., Roos, K.L., Coffey, C.S., García, H.H. (2006). Meta-analysis: Cysticidal drugs for neurocysticercosis: albendazole and praziquantel. *Annals of Internal Medicine*, 145, 43-51.
- Digenis, G.A., Wells, D.A., Ansell, J.M., Blecher, L. (1987). Disposition of [<sup>14</sup>C] povidone after oral administration to the rat. *Food and Chemical Toxicologic*, 25, 241-243.
- Dorais, F., Esch, G. (1969). Growth rate of two *Taenia crassiceps* strains. *Experimental Parasitology*, 25, 395-398.

- Evrard, B., Chiap, P., DeTullio, P., Ghalmi, F., Piel, G., Van Hees, T., Crommen, J., Losson, B., Delattre, L. (2002). Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from a solution containing hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Journal of Control Release*, 85, 45-50.
- Food Drug Administration (FDA) (2007). Albenza. US Department of Health & Human Services. Recuperado el 2 de Marzo de 2009 de: [http://www.fda.gov/medwatch/safety/2007/Aug\\_PI/Albenza\\_PI.pdf](http://www.fda.gov/medwatch/safety/2007/Aug_PI/Albenza_PI.pdf)
- Fragoso, G., Meneses, G., Sciutto, E., Fleury, A., Larralde, C. (2008). Preferential growth of *Taenia crassiceps* cysticerci in female mice holds across several laboratory mice strains and parasite lines. *The Journal of Parasitology*, 94, 551-553.
- Frank, D.W., Gray, E.J., Weaver, R.N. (1976). Cyclodextrin nephrosis in the rat. *American Journal of Pathology*, 83, 367-374.
- Freeman, R. (1962). Studies on the biology of *Taenia crassiceps*. (Zeder, 1800) Rudolphi, 1810. (Cestoda). *Canadian Journal of Zoology*, 40, 969-990.
- Frijlink, H.W., Visser, J., Hefting, N.R., Oosting, R., Meijer, D.K.F., Lerk, C.F. (1990). The pharmacokinetics of  $\beta$ -cyclodextrin and hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin in the rat. *Pharmaceutical Research*, 7, 1248-1252.
- Ganzerli, G., van Santvliet, L., Verschuren, E., Ludwing, A. (1996). Influence of beta-cyclodextrin and various polysaccharides on the solubility of fluorescein and on the rheological and mucoadhesive properties of ophthalmic solutions. *Pharmazie*, 51, 357-362.
- García, J.J., Bolás, F., Torrado, J.J. (2003). Bioavailability and efficacy characteristics of two different oral liquid formulations of albendazole. *International Journal of Pharmaceutics*, 250, 351-358.
- García-Rodríguez, J., Torrado, J., Bolas, F. (2001). Improving bioavailability and anthelmintic activity of albendazole by preparing albendazole-cyclodextrin complexes. *Parasite*, 8, 188-190.
- Gaur, R.L., Dixit, S., Sahoo, M.K. (2007). Anti-filarial activity of novel formulations of albendazole against experimental *Brugian filariasis*. *Parasitology*, 134, 537-544.
- Gerlóczy, A., Fónagy, A., Keresztes, P., Perlaky, L., Szejtli, J. (1985). Absorption, distribution, excretion and metabolism of orally administered  $^{14}\text{C}$ - $\beta$ -cyclodextrin in rat. *Drug Research*, 35, 1042-1047.

- Gobert, G.N. y Jones, M.K. (2008). Discovering new schistosome drug targets: the role of transcriptomics. *Current Drug Targets*, 9, 922-930.
- Gottschall, D.W., Theodorides, V.J., Wang, R. (1990). The metabolism of benzimidazole anthelmintics. *Parasitology Today*, 6, 115-124.
- Hladon, T. & Cwiertinia, B. (1994). Physical and chemical interactions between cellulose ethers and  $\beta$ -cyclodextrins. *Pharmazie*, 49, 497-500.
- Hoerauf, A. (2008). Filariasis: new drugs and new opportunities for lymphatic filariasis and onchocerciasis. *Current Opinion Infectious Diseases*, 21, 673-681.
- Iannuccelli, V., Coppi, G., Leo, E., Fontana, F., Bernabei, M.T. (2000). PVP solid dispersions for the controlled release of furosemide from a floating multiple-unit-system. *Drug Delivery Industrial Pharmacie*, 26, 595-603.
- Imirizaldu, L., Miranda, L., García-Gurtubay I., Gastón, I., Urriza, J., Quesada, P. (2004). Neurocysticercosis. An emergent disease. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 27, 201-209.
- Ingold, K., Bigler, P., Thormann, W., Cavaliero, T., Gottstein, B., Hemphill, A. (1999). Efficacies of albendazole sulfoxide and albendazole sulfone against *in vitro*-cultivated *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, 1052-1061.
- Jiménez-Marcial, M.E., Velásquez-Pérez, L. (2004). Morbilidad en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (1995-2001). *Gaceta Médica de México*, 2, 155-162.
- Jung, H., Hurtado, M., Sanchez, M., Medina, M.T., Sotelo, J. (1990). Plasma and CSF levels of albendazole and praziquantel in patients with neurocysticercosis. *Clinical of Neuropharmacology*, 13, 559-564.
- Jung, H., Medina, L., García, L., Fuentes, I., Moreno-Esparza, R. (1998). Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolite albendazole sulphoxide. *Journal of Pharmaceutics and Pharmacology*, 50, 43-48.
- Jung, H., Hurtado, M., Sánchez, M. (1992). Clinical pharmacokinetic of albendazole in patients with brain cysticercosis. *Clinical Pharmacology*, 32, 28-31.
- Jung, H., Cárdenas, G., Sciutto, E., Fleury, A. (2008). Medical treatment for neurocysticercosis: drugs, indications and perspectives. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8, 424-433.

- Kalaiselvan, R., Mohanta, G.P., Manna, P.K., Manavalan, R. (2006a). Studies on mechanics of enhanced dissolution of albendazole solid dispersion with crystalline carriers. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68, 599-607.
- Kalaiselvan, R., Mohanta, G.P., Manna, P.K., Manavalan, R. (2006b). Multicomponent system of albendazole with cyclodextrin and hydroxyacids. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 48, 19-33.
- Kalaiselvan, R., Mohanta, G.P., Madhusudan, S., Manna, P.K., Manavalan, R. (2007). Enhancement of bioavailability and anthelmintic efficacy of albendazole by solid dispersion and cyclodextrin complexation techniques. *Pharmazie*, 62, 604-607.
- Kearney, A.S., Gabriel, D.L., Mehta, S.C., Radebaugh, G.W. (1994). Effect of polyvinylpyrrolidone on the crystallinity and dissolution rate of solid dispersion of the anti-inflammatory CI 987. *International Journal of Pharmaceutics*, 104, 169-174.
- Khotimchenko, M., Serguschenko, I., Khotimchenko, Y. (2006). Lead absorption and excretion in rats given insoluble salts of pectin and alginate. *International Journal of Toxicology*, 25, 195-203.
- Kubo, W., Miyazaki, S., Dairaku, M., Togashi, M., Mikami, R., Attwood, D. (2004). Oral sustained delivery of ambroxol from in situ-gelling pectin formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 271, 233-340.
- Lacey, E. (1988). The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. *International Journal for Parasitology*, 18, 885-936.
- Leach, A.R. (1991). Conformational analysis. En: Lipkowitz, K.B. y Boyd, D.B. (Eds), *Reviews in Computational Chemistry*, 114-135.
- Liu, L., Fishman, M.L., Kost J., Hicks K.B. (2003). Pectin-based systems for colon-specific drug delivery via oral route. *Biomaterials*, 24, 3333-3343.
- Loftsson, T., Friðriksdóttir, H. (1998). The effect of water-soluble polymers on the aqueous solubility and complexing abilities of  $\beta$ -cyclodextrin. *International Journal of Pharmaceutics*, 163, 115-121.
- Loftsson, T., Brewster, E. (1996). Pharmaceutical Applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 1017-1025.



- Loftsson, T., Friðriksdóttir, H., Sigurðadóttir, A.M., Ueda, H. (1994). The effect of water-soluble polymers on drug-cyclodextrin complexation. *International Journal of Pharmaceutics*, 110, 169-177.
- Mallick, S., Sahoo, A., Mitra, S.S. (2003). Preparation, physicochemical characterization and drug release studies of albendazole solid dispersions. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, 142, 180-186.
- Marriner, S., Morris, D., Dickson, B. (1986). Pharmacokinetics of albendazole in man. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 30, 705-708.
- McCracken, R.O., Lipkowitz, K.B. 1990. Experimental and theoretical studies of albendazole, oxibendazole, and tioxidazole. *Journal of Parasitology*, 76, 853-864.
- McKellar, Q.A., Scott, E.W. (1990). The benzimidazole anthelmintic agents – a review. *Journal of Veterinarian and Pharmaceutical Therapy*, 13, 223-247.
- Minjie, W., Shuhua, X., Junjie, C., Bin, L., Cheng, F., Weixia, S., Hotez, P. (2002). Albendazole-soybean oil emulsion for the treatment of human cystic echinococcosis: evaluation of bioavailability and bioequivalence. *Acta Tropica*, 83, 177-181.
- Moriwaki, C., Costa, G.L., Ferracini, C.N., de Moraes, F.F., Zanin, G.M., Pineda, E.A.G., Matioli, G. (2008). Enhancement of solubility of albendazole by complexation with  $\beta$ -cyclodextrin. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25, 255-267.
- Nagy, J., Schipper, H., Koopmans, R., Butter, J. (2002). Effect of grapefruit juice or cimetidine coadministration on albendazole bioavailability. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66, 260-263.
- Náquira, C. (1996). *Taenia solium*: Ciclo biológico y características. En: García H. y Martínez S. (Eds). *Teniasis/Cisticercosis por T. solium*. (7-16). Universo, Lima, Perú.
- Narang, A.S., Srivastava, A.K. (2002). Evaluation of solid dispersions of clofazimine. *Drug Delivery and Industry Pharmacy*, 28, 1001-1013.
- Palmieri, G.F., Cantalamessa, F., Di Martino, P., Nasuti, C., Martelli, S. (2002). Lonidamine solid dispersions: *In vitro* and *in vivo* evaluation. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28, 1241-1250.
- Palomares, F., Palencia, G., Pérez, R., González-Esquivel, D., Castro, N., Jung, C.H. (2004). *In vitro* effects of albendazole sulphoxide and praziquantel against *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysts. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 1051-1054.

- Pardini, A., Peralta, R., Vaz, A., Machada, L., Paralta, J. (2002). Use of *Taenia crassiceps* cysticercus antigen preparations for detection of antibodies in cerebrospinal fluid samples from patients with neurocysticercosis (*Taenia solium*). *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 1, 190-193.
- Pérez-López, C., Isla-Guerrero, A., Álvarez, F., Budke, M., Fernández-Miranda, J.C., Paz, J.F., Pérez-Álvarez, M. (2003). Actualización en el tratamiento de la neurocysticercosis. *Revista de Neurología*, 36, 805-811.
- Pérez-Serrano, J., Casado, N., Denegri, G. (1994). The effects of albendazole and albendazole sulphoxide combination-therapy on the *Echinococcus granulosus* in vitro. *International Journal for Parasitology*, 24, 219-224.
- Pérez-Serrano, Denegri, N., Casado, N., Rodríguez-Caabeiro, F. (1997). In vivo effect of oral albendazole and albendazole sulphoxide on development of secondary Echinococcosis in mice. *International Journal for Parasitology*, 27, 1341-1345.
- Rajeswari, C., Alka, A., Javed, A., Khar, R.K. (2005). Cyclodextrin in Drug Delivery: An Updated Review. *AAPS PharmSciTech*, 6(2), Article 43. Recuperado el 20 de Febrero de 2009 de: <http://www.aapspharmscitech.org>.
- Ravin, H.A., Seligman, A.M., Fine, J. (1952). Polyvinylpyrrolidone as a plasma expander, studies on its excretion distribution and metabolism. *The New England Journal of Medicine*, 247, 921-929.
- Rawden, H., Kokwaro, G., Ward, S., Edwards, G. (2000). Relative contribution of cytochromes P450 and flavin-containing monooxygenases to the metabolism of albendazole by human liver microsomes. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 49, 313-322.
- Reddy, D.N., Singh, U.V., Pandey, S., Udupa, N. (1992). Evaluation of Piroxicam oral and transdermal preparations. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54, 152-154.
- Redondo, P.A., Álvarez, A.I., García, J.L. (1998). Influence of surfactants on oral bioavailability of albendazole based on the formation of the sulphoxide metabolites in rats. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 19, 65-70.

- Rigter, I.M., Schipper, H.G., Koopmans, R.P. (2004). Relative bioavailability of three newly developed albendazole formulations: a randomized crossover study with healthy volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 1051-1054.
- Rivas, G.C. (2007). *Incremento de la solubilidad del albendazol por medio de  $\beta$ -ciclodextrina y un promotor de absorción*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- Robinson, M.W., McFerran, N., Trudgett, A., Hoey, L., Fairweather, I. (2004). A possible model of benzimidazole binding to  $\beta$ -tubulin disclosed by invoking an inter-domain movement. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 23, 275-284.
- Ross, P.D. & Rekharsky, M.V. (1996). Thermodynamics of hydrogen bond and hydrophobic interactions in cyclodextrin complexes. *Biophysical Journal*, 71, 2144-2454.
- Rossi, N., Rivas, I., Hernández, M., Urdaneta, H. (2000). Immunodiagnosis of neurocisticercosis comparative study of antigenic extracts from cysticercus cellulosae and *Taenia crassiceps*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 52, 157-164.
- Savolainen, J., Jarvinen, K., Taipale, H., Jarho, P., Loftsson, T., Jarvinen, T. (1998). Co-administration of a water-soluble polymer increases the usefulness of cyclodextrins in solid oral dosage forms. *Pharmaceutical Research*, 15, 1696-1701.
- Sethia, S., Squillante, E. (2004). Solid dispersion of carbamazepine in PVP K30 by conventional solvents evaporation and supercritical methods. *International Journal of Pharmacy*, 19, 1-10.
- Shimpi, S., Chauhan, B., Shimpi, P. (2005). Cyclodextrins: Applications in different routes of drug administration. *Acta Pharmaceutica*, 55, 139-156.
- Shizuka, F., Hara, K., Hashimoto, H. (1996). *Dietary fibre-like effects of orally administered cyclodextrins in the rat*. Proceedings of the first International Symposium on Cyclodextrins. (157-160). Szejtli J and Szenté L (Eds). Kluwer Academic Publishers, Budapest, Hungary.
- Siebert, A., Good, A., Simmons, J. (1978) Ultrastructural aspects of early immune damage to *Taenia crassiceps* metacestodes. *International Journal for Parasitology*, 8, 45-50.

- Smith, A.L., Rego, L.P., Williams, R. (1997). Albendazole monitoring. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 54, 319-320.
- Smyth, J. (1981). Physiology of cestodes. En Hodder and Stoughton (Eds). *Introduction to Animal Parasitology* (278-298). Hillsdale, N.J., USA.
- Stella, V.J., He, Q. (2008). Cyclodextrins. *Toxicologic Pathology*, 36, 30-42.
- Stella, V.J., Rajewski, R.A. (1997). Cyclodextrins: their future in drug formulation and delivery. *Pharmaceutical Research*, 14, 556-567.
- Szejtli, J., Fromming, K.H. (1994). *Cyclodextrin in pharmacy*. Dordrecht, Netherlands: Klumer academic Publisher.
- Szejtli, J. (1987). The metabolism, toxicity and biological effects of cyclodextrins. *Cyclodextrins and their Industrial Uses*. Paris, France: Editions de Santé.
- Szejtli, J. (1988). *CD Technology*. Dordrecht, Netherlands: Klumer academic Publisher.
- Szejtli, J. (1998). Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chemical Reviews*, 98, 1743-1753.
- Takayanagui, O. (2004). Therapy for Neurocysticercosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 4, 129-139.
- Tantishaiyakul, V., Kaewnopparat, N., Ingkatawornwong, S. (1996). Properties of solid dispersions of piroxicam in polyvinylpyrrolidone K30. *International Journal of Pharmaceutics*, 143, 59-66.
- Tantishaiyakul, V., Kaewnopparat, N., Ingkatawornwong, S. (1999). Properties of solid dispersions of piroxicam in polyvinylpyrrolidone. *International Journal of Pharmaceutics*, 181, 143-151.
- Theodorides, V.J., Carakostas, M.C., Colaianne, J.J., Freeman, J.F., Page, S.W. (1993). Safety of albendazole in developing bovine fetuses. *American Journal of Veterinary Research*, 54, 2171-2174.
- Thompson, D.O. (1997). Cyclodextrins-enabling excipients: their present and future use in pharmaceuticals. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 14, 1-104.
- Torrado, S., Torrado, S., Torrado, J.J., Cardónniga, R. (1996). Preparation, dissolution and characterization of albendazole solid dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 140, 247-250.

- Torrado, S., López, M.L., Torrado, G., Bolas, F., Torrado, S., Cadorniga, R. (1997). A novel formulation of albendazole solution: oral bioavailability and efficacy evaluation. *International Journal of Pharmaceutics*, 156, 181-187.
- Truong, C.T., T., Faivre, V., Nguyen, T.T., Heras, H., Pirot, F., Walchshofer, N., Sarciron, M.E., Falson, F. (2008). Study on the hydatid cyst membrane: permeation of model molecules and interactions with drug-loaded nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 353, 223-32.
- Uekama, K., Hirayama, F., Irie, T. (1994). Application of cyclodextrins in pharmaceutical preparations. *Drug Target and Delivery*, 3, 411-456.
- Váldez, J., Cedillo, R., Hernández-Campos, A., Yépez, L., Hernández-Luis, F., Navarrete-Vázquez, G., Tapia A, Cortés, R., Hernández, M., Castillo, R. (2002). Synthesis and antiparasitic activity of 1H-benzimidazole derivatives. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 12, 2221-2224.
- Valero, M., Pérez-Revuelta, B.I., Rodríguez, L.I. (2003). Effect of PVP K-25 on the formation of the naproxen:  $\beta$ -ciclodextrin complex. *International Journal of Pharmaceutics*, 253, 97-110.
- van Helden, S.P. (1992). Structure and stability of cyclodextrin complexes: a molecular modeling study. Ph.D. Thesis, Faculty of Pharmacy, Utrecht University, The Netherlands.
- Velásquez-Pérez, L., Jiménez-Marcial, M.E. (2004). Mortalidad hospitalaria en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez" (1995-2001). *Gaceta Médica de México*, 3, 289-294.
- Williams, J., Engelkirk, P., Lindsay, M. (1982). Mechanisms of immunity in rodent cysticercosis. En: Flisser A, Willms K, Laclette J, (Eds.) *Cysticercosis: Present state of knowledge and perspectives*. (621-632). Nueva York, USA: Academic Press.
- Wen, H., Morris, K.R., Park, K. (2005). Study on the interactions between polyvinylpyrrolidone (PVP) and acetaminophen crystals: Partial dissolution pattern change, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94, 2166-2174.
- World Health Organization (WHO) (1974). Pectin in: Seventeenth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, *World Health Organization*, Technical Reports, 53; *FAO Nutrition Meeting Report*, 53. Recuperado el 7 marzo del 2009 de: <http://www.inchem.org/document/jecfa/jecmono/vo5je82.htm>.

- Yamamoto, M., Aritomi, H., Irie, T., Hirayama, F., Uekama, K. (1990). Pharmaceutical evaluation of branched  $\beta$ -cyclodextrins as parenteral drugs carriers. Minutes of the Fifth International Symposium on cyclodextrins. (Duchêne D, Ed), Editions de Santé, paris, France. 541-544.
- Yoshida, A., Yamamoto, M., Hirayama, F., Uekama, K. (1988). Improvement of chemical instability of digitoxin in aqueous solution by complexation with beta-cyclodextrin derivatives. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36, 4075-4080.

## **11. ANEXOS**

**Anexo 1. Resúmenes de congresos**

**Anexo 2. Artículo publicado**

**Anexo 3. Artículo enviado a publicación**

**1) Congreso Internacional “50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Western Pharmacology Society”**

Fecha: Marzo, 2007. Banff, Alberta, Canada.

Titulo del trabajo: *Evaluation of the efficacy of new benzimidazolic derivatives on Taenia crassiceps cysts.*

Autores: Francisca Palomares-Alonso, Francisco Hernández-Luis, Guadalupe Palencia, Rafael Castillo, Alicia Hernández-Campos y Helgi Jung Cook.

Although albendazole (ABZ) is the drug of choice for Neurocysticercosis treatment, its bioavailability is limited by its absorption in the gastrointestinal tract. This fact is related to its low solubility; therefore more research is required in order to find new molecules with cestocidal activity. In the present study the *in vitro* activity of seven new benzimidazolic derivatives and albendazole sulphoxide (ABZSO, active metabolite of ABZ) against *Taenia crassiceps* cysts were evaluated. The benzimidazolic derivatives were evaluated at two concentrations 0.28  $\mu\text{M}$  and 1.7  $\mu\text{M}$  which represent the  $\text{EC}_{50}$  and  $\text{EC}_{90}$  of ABZSO respectively. Cell Culture flasks were filled with 5 ml of culture medium containing each compound. 25 cysts were deposited in each flask and incubated at 37°C with 5%  $\text{CO}_2$ . Each experiment was run by triplicate. Parasites were observed every day with an inverted light microscope during 11 days. The criteria to assess parasite mortality were: loss of vesicular fluid, paralysis of membrane and cyst collapse. Our results showed that three of the compounds (FHL-18, FHL-19 and JVG40) exhibited cestocidal activity. The activity of FHL-18 and FHL-19 was similar to that found with ABZSO. Both compounds were equally potent, ( $\text{EC}_{50}$  values of 0.81  $\mu\text{M}$  and 0.95  $\mu\text{M}$  respectively) and less potent than ABZSO (0.28  $\mu\text{M}$ ). Data showed that as ABZSO, the *in vitro* activity was concentration-time-dependent. These compounds showed greater solubility than ABZ. The good solubility of the compounds together with the cystocidal activity indicates that the novel compounds could be an alternative in the treatment of neurocysticercosis.



## 2) XXII Reunión anual de investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Fecha: Mayo, 2007. México D.F.

Título del trabajo: *Evaluación de la actividad cisticida de nuevos derivados benzimidazólicos*

Autores: Francisca Palomares, Guadalupe Palencia, Alma Ortiz-Plata, Helgi Jug Cook

Aún cuando el Albendazol (ALB) es el fármaco de elección en el tratamiento de la Neurocisticercosis, su absorción y por ende su biodisponibilidad está limitada por su baja solubilidad en el tracto gastrointestinal, por lo que se requiere continuar con la investigación de nuevas moléculas con actividad cisticida y mejores propiedades fisicoquímicas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad *in vitro* de siete nuevos derivados benzimidazólicos en cisticercos de *Taenia crassiceps*. *Metodología.* Los 7 nuevos derivados y el metabolito activo del ALB, sulfóxido de albendazol (SOALB), usado como estándar de comparación, se disolvieron en DMSO y se realizaron las diluciones pertinentes en medio de cultivo para obtener concentraciones en el rango de 0.14 –2.7  $\mu\text{M}$ . Los cisticercos se colocaron en cajas conteniendo 5 mL de medio de cultivo adicionado con cada compuesto y se incubaron a 37°C y 5% de  $\text{CO}_2$  durante once días. La mortalidad fue evaluada cada tercer día empleando un microscopio de luz invertida. El día 11 se realizó una prueba de tinción con azul de tripano. El criterio de mortalidad fue la pérdida de fluido quístico, parálisis de la membrana y el colapso del parásito. A partir de las curvas concentración-respuesta se calculó la concentración efectiva 50 ( $\text{CE}_{50}$ ). *Resultados.* Tres de los derivados benzimidazólicos evaluados (FHL18, FHL19 y JVG40) presentaron actividad cisticida. La actividad de los compuestos FHL-18 y FHL19 fue similar a la encontrada con SOALB y esta actividad fue concentración-tiempo dependiente. Los valores de  $\text{CE}_{50}$  encontrados para FHL18, FHL19 y SOALB: 0.65  $\mu\text{M}$  (0.32-1.15), 0.92  $\mu\text{M}$  (0.47-1.83) y 0.26  $\mu\text{M}$  (0.16-0.4) respectivamente, mostraron que el compuesto FHL18 fue igualmente potente que SOALB mientras que el compuesto FHL19 fue menos potente.

*Conclusiones.* La actividad cestocida encontrada de FHL18, FHL19, aunada a su alta solubilidad, indican que estos nuevos derivados benzimidazólicos podrían representar una alternativa en el tratamiento de la neurocisticercosis.

### 3) Congreso Internacional “52<sup>th</sup> Annual Meeting of the Western Pharmacology Society”

Fecha: Febrero, 2009. Acapulco, México.

Titulo del trabajo de investigación: *Evaluation of two new albendazole-cyclodextrins-polymer systems: dissolution studies, oral bioavailability and cysticidal activity*

Autores: Francisca Palomares-Alonso, Cesar Rivas-González, Guadalupe Palencia-Hernández, Iliana González-Hernández, Nelly Castro-Torres, Ma. Josefa Bernard Bernard y Helgi Jung-Cook.

Different strategies have been developed in order to improve the aqueous solubility of albendazole (ABZ) and also its bioavailability, such as the use of surfactants and the complexation with cyclodextrins (CDs). However, little attention has been focused on the use of third components, such as water-soluble polymers, for improving the properties of drug-CD systems. The main purpose of this work was to evaluate the effect of the ABZ- $\beta$ CD formulation (1:1) in combination with two water-soluble polymers: pectine (PEC) and polivinilpirrolidone (PVP), on the dissolution rate and cysticidal efficacy and bioavailability. The bioavailability study was done with the formulation which showed the highest efficacy. Dissolution behavior was evaluating using USP apparatus 2. To assess the cysticidal activity, a cysticercosis murine model caused by *Taenia crassiceps* was used. Oral bioavailability was performed on rats and plasma concentrations of albendazole sulphoxide (ABZSO) (main metabolite of ABZ), were assayed by HPLC.

Our results showed that the ABZ- $\beta$ CD-PVP formulation showed the highest dissolution rate (78.5%) and the highest cysticidal activity (83%). Also the bioavailability was significantly increased (2.3 fold) after its administration. Taking in account these results we consider that the ternary system ABZ- $\beta$ CD-PVP could be used a potential pharmaceutical alternative in treatment of systemic helminthic diseases in developing countries and it is worth to continue their evaluation.

## **Anexo 2. Artículo publicado**

**Synthesis and *in vitro* cysticidal activity of new benzimidazole derivatives.**

**Palomares-Alonso, F.,** Jung-Cook, H., Pérez-Villanueva, J., Piliado, J.C., Rodríguez-Morales, S., Palencia-Hernández, G., López-Balbiaux, N., Hernández-Campos, A., Castillo, R., Hernández-Luis, F. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2009, 44, 1794-800.

### **Anexo 3. Artículo enviado a publicación**

**Two novel ternary albendazole-cyclodextrin-polymer systems: dissolution, bioavailability and efficacy against *Taenia crassiceps* cysts.**

Francisca Palomares-Alonso, Cesar Rivas González, Guadalupe Palencia Hernández, María Dolores Castillo Montiel, Iliana González-Hernández, Nelly Castro-Torres, Ma. Josefa Bernad-Bernad, Enrique Pinzón Estrada and Helgi Jung-Cook



Short communication

## Synthesis and *in vitro* cysticidal activity of new benzimidazole derivatives

Francisca Palomares-Alonso <sup>a,c</sup>, Helgi Jung-Cook <sup>a,c</sup>, Jaime Pérez-Villanueva <sup>c</sup>,  
Juan Carlos Piliado <sup>a</sup>, Sergio Rodríguez-Morales <sup>c</sup>, Guadalupe Palencia-Hernández <sup>b</sup>,  
Nayeli López-Balbiaux <sup>c</sup>, Alicia Hernández-Campos <sup>c</sup>, Rafael Castillo <sup>c</sup>,  
Francisco Hernández-Luis <sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Neuropsicofarmacología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México DF 14269, Mexico

<sup>b</sup> Laboratorio de Neuroinmunología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, México DF 14269, Mexico

<sup>c</sup> Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF 04510, Mexico

Received 14 November 2007; received in revised form 18 April 2008; accepted 5 May 2008

Available online 15 May 2008

### Abstract

Despite albendazole being the drug of choice in neurocysticercosis treatment, its low solubility limits its bioavailability; therefore, more research is required in order to find new molecules with cestocidal activity and adequate aqueous solubility. A set of 13 benzimidazole derivatives were synthesized and their *in vitro* activities were evaluated against *Taenia crassiceps* cysts, using albendazole sulfoxide as reference molecule, showing that two of them exhibited good activity. Molecular modelling revealed that the cysticidal efficacy depends on the presence on the molecule of an H in the 1-position, a planar carbamate group at 2-position, and if the substituent in 5-position is voluminous, it should be orthogonal to the benzimidazole ring.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Benzimidazole analogues; Cysticidal activity; Molecular modelling

### 1. Introduction

Cysticercosis, the infection caused by the larval stage of the tapeworm *Taenia solium*, is the most common parasitic disease of the nervous system in humans and the single most common cause of acquired epileptic seizures in the developing world, specially Latin America, India, Africa, and China [1,2]. The treatment of neurocysticercosis has evolved from surgical therapy in the past to anticysticercal chemotherapy. Praziquantel and albendazole (ABZ) are the drugs commonly used for the treatment of this disease [3,4], and both undergo extensive metabolism by cytochrome P450 [5,6]. Up-to-date ABZ is the

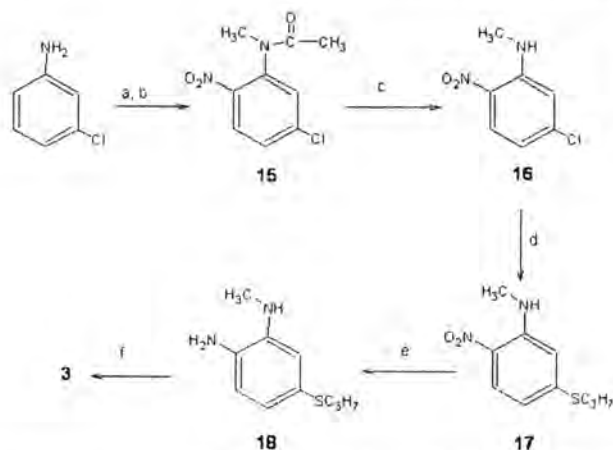
drug of choice for neurocysticercosis treatment, however, its bioavailability is limited by its low solubility in the gastrointestinal tract; therefore, a high inter-individual variability in plasma levels and in efficacy has been found [7]. Considering that the search for new alternatives is still necessary, we synthesized 13 benzimidazole derivatives and their activities against *Taenia crassiceps* cysts were evaluated using albendazole sulfoxide **1**, which is the active metabolite of ABZ [8], as reference molecule. Also to understand the requirements for activity a molecular modelling study was performed.

### 2. Chemistry

Compound **1** was obtained by the treatment of ABZ with 3-chloroperbenzoic acid. Compound **2** was prepared by the methylation of ABZ with methyl iodide in methanol in the presence of potassium hydroxide. For the synthesis of compound **3**, the

\* Corresponding author. Tel.: +55 56063822.

E-mail addresses: [ingpalomares@yahoo.com.mx](mailto:ingpalomares@yahoo.com.mx) (F. Palomares-Alonso), [franher@servidor.unam.mx](mailto:franher@servidor.unam.mx) (F. Hernández-Luis).



Scheme 1. Synthesis of compound 3. Reagents and conditions: (a)  $(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$ ,  $\text{HNO}_3$ ; (b)  $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4/\text{NaOH}$ ; (c)  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\Delta$ ; (d)  $\text{C}_3\text{H}_7\text{SH}$ ; (e)  $\text{H}_2/\text{C}-\text{Pd}$  5%; (f) 2-methyl-2-thiopseudourea hemisulfate salt, methyl chloroformate,  $\text{pH} = 8$ ,  $\Delta$ .

sequence shown in Scheme 1 was followed. The synthesis began with the nitration of 3-chloroaniline by using fuming nitric acid and acetic anhydride, the product was treated with dimethyl sulfate and KOH to give the *N*-methylated acetamide **15**. The hydrolysis of this compound with  $\text{H}_2\text{SO}_4$  led to *N*-methyl-2-nitroaniline **16**. Aromatic nucleophilic substitution in **16** with 1-propanethiol afforded **17** which upon catalytic reduction with hydrogen and C–Pd 5% gave 1,2-phenylenediamine **18**. Reaction of this compound with 2-methyl-2-thiopseudourea hemisulfate salt, methyl chloroformate and NaOH yielded **3**. Compounds **4–9** were prepared as described in Scheme 2. The required substituted 1,2-phenylenediamines (**23–26**) were prepared by the reduction of the corresponding 2-nitroanilines (**19–22**) with hydrogen in the presence of 5% palladium on carbon. The products of reduction without isolation were cyclocondensed with 2-methyl-2-thiopseudourea hemisulfate salt, methyl chloroformate and NaOH to give the corresponding methyl benzimidazole-2-carbamates **4**, **8**, **9** and **27**. Compound **27** was converted to acylchlorides with  $\text{SOCl}_2$  and then dehydrohalogenation between this acylchloride and 4-nitrobenzyl alcohol or piperidine or diethylamine gave **5**, **6** or **7**, respectively. Finally compounds **8–14** were prepared by known procedures [9,10,14].

### 3. Results and discussion

All compounds synthesized (**1–14**) were obtained as solids with sharp melting points and their structures were established by IR,  $^1\text{H}$  NMR and MS. Compounds **1**, **8–14** were characterized and the melting points and spectroscopic data were compared with those previously reported by our group [11–14].

#### 3.1. *In vitro* cysticidal activity

The *in vitro* cysticidal activity evaluations were performed on *T. crassiceps* cysts (ORF strain), which have been previously

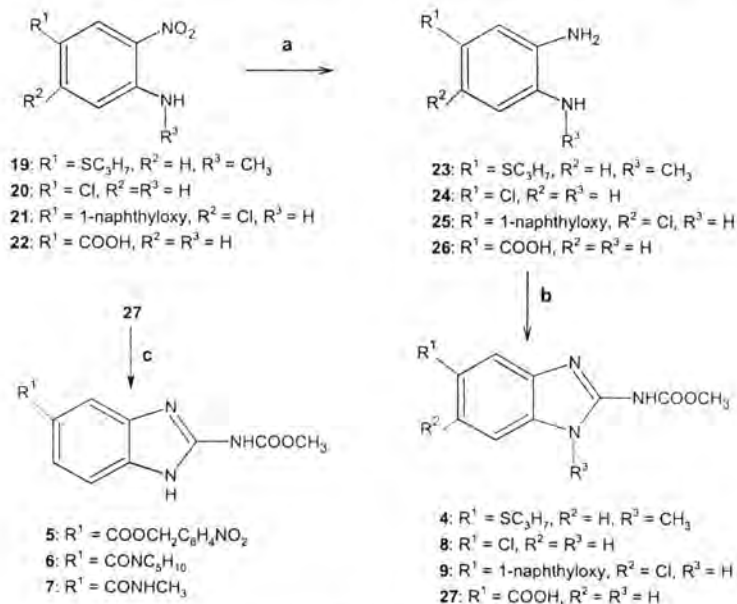
used as a model for the evaluation of cestocidal drugs [15], and albendazole sulfoxide **1** was used as the standard drug. We found that among the 13 investigated compounds, only **5**, **6** and **8** showed activity against *T. crassiceps* cysts of ORF strain (Table 1). The cysticidal activity of **5** and **6** was close to that exhibited by **1**; while **8** showed a lower activity. Compound **9** was not evaluated due to its insolubility in the culture media. Those compounds that exhibited activity against *T. crassiceps* cysts of ORF strain were evaluated on WFU strain (which has scolex). We found that **5**, **6** and **8** also exhibited activity against *T. crassiceps* of WFU strain. To note, **5** behaved similarly as **1**, while the activity of **6** and **8** was lower. Interestingly the activity of compounds in this strain was lower. This fact could be due to the size of the cysts, since cysts of WFU strain are larger (3–5 mm) than ORF cysts (2–3 mm) or due to the presence of the scolex, which has been suggested to have a specialized nutritional function and could help the parasite to resist the drugs' action [16,17].

The *in vitro* study results showed that the introduction of a methyl group instead of an H moiety at 1-position completely abolished the activity (**3** and **4**). In the case of **2** when the H atom in the *N*-carbamate was replaced with a methyl group, the activity decreased drastically, indicating that the protons in *N*-carbamate and in 1-position are necessary for the cysticidal activity. Also the derivatives containing methylthio instead of *N*-carbamate group (**10–13**) at 2-position were all inactive, confirming the importance of this group for the activity of the molecule. When the effect of the substituents at the 5-position was evaluated, we found that when the propylthio group at 5-position was replaced with larger groups such as 4-nitrobenzoyl carboxylate or piperidiny-carboxamide (**5** or **6**) the activity was conserved and was close to that exhibited by **1**. In the case of **8**, the presence of a chlorine atom in the benzimidazole ring reduced the activity significantly; while the introduction of the *N*-methylcarboxamide abolished the activity of **7**.

#### 3.2. Molecular modelling studies

In an attempt to identify the structural requirements for the cysticidal activity, molecular studies were performed on compounds **1–9**. Compounds **10–14** were excluded since these molecules with methylthio group at 2-position were ineffective. Although compounds **2–4** resulted ineffective, they were included in the analysis due to the presence of the methyl carbamate group at 2-position.

The conformational analysis was performed and the main molecular descriptors were obtained. All the molecular descriptors were correlated with the *in vitro* activity against *T. crassiceps* cysts using the QSAR module in Sybyl V. 7.3. Fig. 1 represents the lowest energy conformer of compounds **1–4** for comparison of the substituents at 1- and 2-positions. Fig. 2 shows the lowest energy conformer of compounds **1** and **5–9**. These figures provide visual evidence for the structural similarities and differences between these compounds. It can be seen that the introduction of the methyl group in both positions, *N*-carbamate (**2**) or at benzimidazole 1-position



Scheme 2. Synthesis of compounds 4–9. Reagents and conditions: (a) H<sub>2</sub>/C–Pd 5%; (b) 2-methyl-2-thiopseudourea hemisulfate salt, methyl chloroformate, pH = 8, Δ (c) thionyl chloride.

(compounds **3** and **4**) (Fig. 1a), precludes the planarity of the carbamate group which is observed in **1** (Fig. 1b). This feature could be important since the theoretical studies have shown that a planar conformation of **1** could facilitate its accommodation into the cleft of the *Haemonchus contortus* β-tubulin model [18].

We also found that the cysticidal activity was maintained when groups at 5-position could adopt the orthogonal conformation to the plane of the benzimidazole ring [4-nitrobenzyl carboxylate (**5**) and piperidinyl-carboxamide (**6**) (Fig. 2a)]. Our data are in agreement with those obtained by McCracken and Lipkowitz, in *Hymenolepis diminuta* [19], who found that those anthelmintics which have substituents at 5-position twisted out-of-plane are more active than those which have substituents at 5-position in plane. Although, in compound **8** (Fig. 2a), the substituent in 5-position was planar, the modest cysticidal activity could be explained considering that the chlorine atom could accommodate into the β-tubulin cleft. Compound **7** resulted to be inactive mainly due to the presence of the group *N*-methylcarboxamide at 5-position of the benzimidazole ring that is not orthogonal in the plane. Although the conformational study showed that **9** complied with the presence of the protons in *N*-carbamate and in 1-position of benzimidazole ring as well as with the “L” shape at 5-position (Fig. 2b), its activity was limited due to its low solubility. This characteristic is very common in benzimidazoles and should also be considered in the design of new derivatives.

The molecular descriptors of **1** and **5–9** are listed in Table 2. Correlations of descriptors with determined experimental activity were performed in order to identify which molecular features have influence on the cysticidal activity, and only a weak correlation with HOMO was found ( $r = 0.399$ ). These results did not agree with a previous study realized by

McCracken and Lipkowitz in *H. diminuta* [19], which reported a good correlation between the HOMO and PSA descriptors with the anthelmintic activity. This fact could be due to the differences in the biological evaluation parameters used, since the authors of Ref. (9) used the dose that is required to reduce the worm burden by 75%, while we used a fixed concentration of all compounds. Other factors could be due to the differences between the cestodes. More studies should be done with the active compounds in order to evaluate the molecular descriptors for cysticidal activity.

#### 4. Conclusion

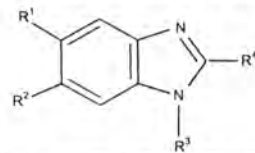
In summary we found that among the investigated compounds, **5** and **6** showed good cysticidal activity. These outcomes are very promising and our current efforts will focus on further evaluation to explore their *in vivo* efficacy. Additionally our results suggest that for cysticidal activity the molecule must have an H at 1-position, a methyl carbamate group at 2-position and an orthogonal substituent at 5-position.

#### 5. Experimental protocols

##### 5.1. Chemistry

Melting points were determined in one-end open capillary tubes on a Büchi B-540 melting point apparatus and are uncorrected. Reactions were monitored by TLC on 0.2 mm pre-coated silica gel 60 F254 plates (E. Merck). The spots were visualized under ultraviolet lamp. IR spectra were recorded on a Perkin Elmer FT-IR-1600 spectrophotometer as potassium bromide discs. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra were measured with a Varian EM-390 (300 and 75.5 MHz)

Table 1  
Structure and biological activity of compounds 1–14 against *T. crassiceps* ORF and WFU strains



Compound	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	Cysts' mortality (%)			
					ORF strain		WFU strain	
					0.28 μM	1.70 μM	0.28 μM	1.70 μM
1	S(O)C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	46 ± 5	88 ± 7	25 ± 2.3	35 ± 2.3
2	SC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	H	N(CH <sub>3</sub> )CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0	0	ND	ND
3	H	SC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	CH <sub>3</sub>	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0	0	ND	ND
4	SC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	H	CH <sub>3</sub>	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0	0	ND	ND
5		H	H	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	41 ± 4.6	68 ± 7	22.6 ± 2.3	26 ± 4
6		H	H	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	37 ± 6.1	62 ± 8	9.3 ± 2.3	16.7 ± 3
7		H	H	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	0	0	ND	ND
8	Cl	H	H	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	15 ± 2.3	23 ± 2.3	5 ± 2.3	8 ± 0
9		Cl	H	NHCO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	ND	ND	ND	ND
10		H	H	SCH <sub>3</sub>	0	0	ND	ND
11		Cl	H	SCH <sub>3</sub>	0	0	ND	ND
12		H	H	SCH <sub>3</sub>	0	0	ND	ND
13		Cl	H	SCH <sub>3</sub>	0	0	ND	ND
14		H	H	SCH <sub>3</sub>	0	0	ND	ND

"ND" indicates that the *in vitro* activity was not determined.



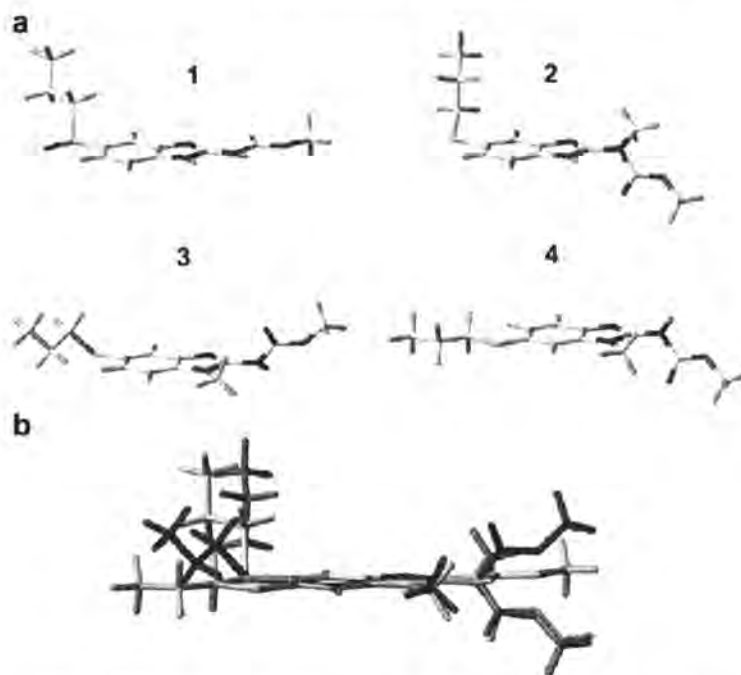


Fig. 1. Lowest energy conformer of compounds 1–4. (a) Compounds modelled. (b) Superimposition of 1 (yellow), 2 (magenta), 3 (cyan) and 4 (purple), which were colored for better understanding. Methyl carbamate group of benzimidazole is planar, while the carbamate group of compounds 2–4 is outside the plane due to the steric effect of methyl group. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

spectrometer. Chemical shifts ( $\delta$ ) are given in parts per million (ppm) using tetramethylsilane ( $\text{Me}_4\text{Si}$ ) as an internal standard;  $J$  values are given in Hz. The following abbreviations are used: s, singlet; d, doublet; q, quartet; dd, doublet of doublet; t, triplet; m, multiplet; bs, broad signal. MS were recorded on a JEOL JMS-SX102A spectrometer by electron impact (EI) or fast atomic bombardment (FAB). Starting materials 3-chloroaniline, 20, 22 and ABZ were purchased from Sigma Aldrich Company.

#### 5.1.1. Methyl methyl[5-(propylthio)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate (2)

M.p. 80–82 °C. IR  $\nu$ : 3333.18, 2956.25, 2870.21, 1702.88, 1546.67, 1454.16, 1198.50, 1165.06, 1107.82  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 0.935 (t, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ,  $J = 7.2$  Hz), 1.524 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ,  $J = 6.8$  Hz), 2.848 (t, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ,  $J = 7.2$  Hz), 3.469 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.839 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.112 (dd, 1H, H-6,  $J_{6,7} = 8.4$ ,  $J_{6,4} = 1.6$  Hz), 7.394 (d, 1H, H-7,  $J = 8.1$  Hz), 7.476 (d, 1H, H-4,  $J = 1.6$  Hz), 11.992 (s, 1H, exchangeable with  $\text{D}_2\text{O}$ ) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 13.99, 22.078, 33.661, 36.487, 53.768, 111.914, 113.361, 117.544, 119.164, 124.106, 127.078, 132.526, 134.033, 139.626, 141.283, 148.961, 154.203 ppm; EI-MS  $m/z$ : 279  $[\text{M}]^+$  (100%).

#### 5.1.2. Methyl [1-methyl-6-(propylthio)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate (3)

M.p. 142.1–143.4 °C. IR  $\nu$ : 3255.97, 2964.50, 2869.96, 1628.59, 1590.14, 1450.93, 1219.37, 1173.80, 1088.48  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 1.022 (t, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ,  $J = 7.2$  Hz), 1.650 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ,

$J = 7.5$  Hz), 2.904 (t, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ,  $J = 7.2$  Hz), 3.660 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.796 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.226 (d, 1H, H-4,  $J = 7.8$  Hz), 7.249 (dd, 1H, H-5,  $J_{5,4} = 7.5$ ,  $J_{5,7} = 1.2$  Hz), 7.286 (d, 1H, H-7,  $J_{5,7} = 1.2$  Hz), 9.631 (s, 1H, exchangeable with  $\text{D}_2\text{O}$ ) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 13.283, 22.500, 28.581, 37.501, 52.755, 111.126, 111.314, 125.886, 127.062, 131.010, 131.170, 153.673, 163.238 ppm; FAB-MS  $m/z$ : 280  $[\text{M} + 1]^+$ .

#### 5.1.3. Methyl [1-methyl-5-(propylthio)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate (4)

M.p. 120.5–122.1 °C. IR  $\nu$ : 3286.98, 2956.08, 2929.46, 2868.25, 1631.18, 1490.64, 1451.44, 1217.44, 1172.07, 1086.47  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 0.938 (t, 3H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ,  $J = 7.5$  Hz), 1.532 (m, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ,  $J = 7.5$  Hz), 2.858 (t, 2H,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}$ ,  $J = 6.9$  Hz), 3.468 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.607 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 7.190 (dd, 1H, H-6,  $J_{6,7} = 8.4$ ,  $J_{6,4} = 1.5$  Hz), 7.326 (d, 1H, H-7,  $J = 8.4$  Hz), 7.427 (d, 1H, H-4,  $J = 1.4$  Hz), 11.981 (s, 1H, exchangeable with  $\text{D}_2\text{O}$ ) ppm;  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 13.019, 21.994, 28.035, 36.162, 51.722, 109.645, 112.782, 124.351, 128.713, 129.214, 129.562, 153.511, 162.517 ppm; FAB-MS  $m/z$ : 280  $[\text{M} + 1]^+$ .

#### 5.1.4. 4-Nitrobenzyl-2-[(methoxycarbonyl)amino]-1H-benzimidazole-5-carboxylate (5)

M.p. 319.6–320.3 °C. IR  $\nu$ : 3382.02, 1708.07, 1652.23, 1272.12, 1186.56, 852.11  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$ : 3.776 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 5.496 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{O}$ ), 7.491 (dd, 1H, H-6,  $J_{6,7} = 8.5$ ,  $J_{6,4} = 1.0$  Hz), 7.752 (d, 2H, H-2',  $J = 8.6$  Hz), 7.801 (d, 1H, H-7,  $J = 8.5$  Hz), 8.119 (d, 1H, H-4,  $J = 1.0$  Hz), 8.274 (d, 2H, H-3',  $J = 8.6$  Hz), 11.981

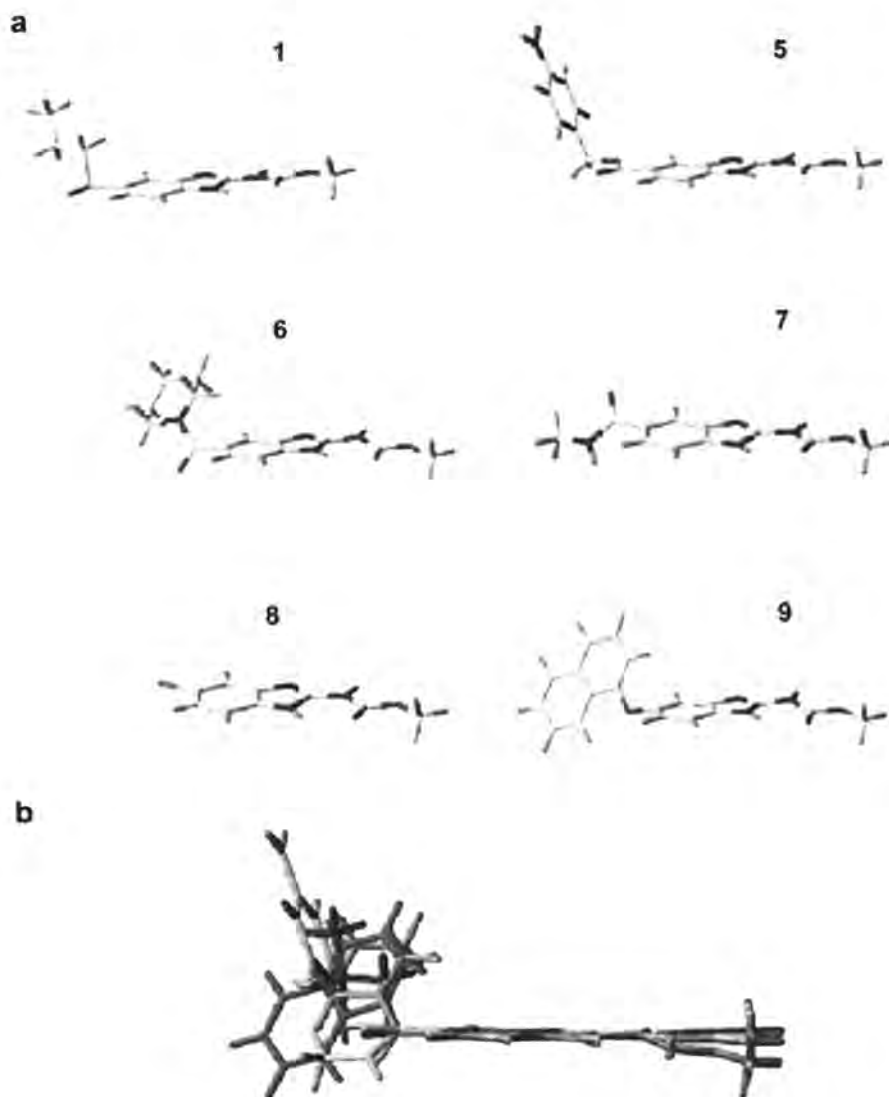


Fig. 2. Lowest energy conformer of compounds **1** and **5–9**. (a) Compounds modelled. (b) Superimposition of **1** (blue), **5** (cyan), **6** (orange), **7** (yellow), **8** (violet) and **9** (red), which were colored for better understanding. In all the molecules, except **7** and **8**, substituent at 5-position was orthogonal to benzimidazole ring. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(bs, 1H, exchangeable with D<sub>2</sub>O) ppm; FAB-MS *m/z*: 371 [M + 1]<sup>+</sup>.

#### 5.1.5. Methyl [5-(piperidin-1-ylcarbonyl)-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate (**6**)

M.p. 296–297 °C. IR  $\nu$ : 3339.01, 2932.17, 2849.02, 1734.11, 1627.01, 1596.02, 1423.11, 1259.10, 1237.02 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 1.406 (bs, 2H, H-3'), 1.652 (bs, 4H, H-2', H-4'), 3.551 (bs, 4H, H-1', H-6'), 3.802 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 7.011 (dd, 1H, H-6,  $J_{6,7} = 8.5$ ,  $J_{6,4} = 1.0$  Hz), 7.452 (d, 2H, H-4), 11.670 (bs, 1H, exchangeable with D<sub>2</sub>O) ppm; EI-MS *m/z*: 301 ([M]<sup>+</sup> 50%), 269 (100%).

#### 5.1.6. Methyl [5-[(methylamino)carbonyl]-1H-benzimidazol-2-yl]carbamate (**7**)

M.p. 368 °C. IR  $\nu$ : 3298, 2947, 1638, 1587 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$ : 3.520 (s, 3H, CONHCH<sub>3</sub>), 3.620 (s, 3H,

NHCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 7.440 (d, 1H, H-7,  $J = 8.4$  Hz), 7.810 (dd, 1H, H-6,  $J_1 = 8.4$ ,  $J_2 = 1.5$  Hz), 7.980 (d, 1H, H-4,  $J = 1.2$  Hz), 8.390 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H, exchangeable with D<sub>2</sub>O, NHCH<sub>3</sub>), 12.21 (bs, 1H, exchangeable with D<sub>2</sub>O, NHCO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) ppm; EI-MS *m/z*: 232 ([M]<sup>+</sup> 5%), 200 (100%).

#### 5.2. In vitro activity

The *in vitro* cysticidal activity evaluations were performed on *T. crassiceps* cysts due to its similarity with *T. solium* cysts [16,20]. Cysts were obtained from experimentally infected male BALB/c mice (two months old). After three months the mice were killed by cervical dislocation and the cysts were removed from the peritoneal cavity. The parasites were washed with sterile 0.9% saline solution and only those cysts exhibiting intact bladder surface were used for the

Table 2  
Molecular descriptors retrieved from molecular modelling calculations

Compound	HF (kcal/mol)	MV ( $\text{\AA}^3$ )	HOMO (eV)	LUMO (eV)	IP (eV)	DM (Debye)	log <i>P</i>	PSA ( $\text{\AA}^2$ )
1	-53.20	832.18	-8.88	-0.26	8.88	5.35	1.54	150.77
5	-60.45	1030.07	-9.14	-1.15	9.14	8.55	3.12	216.07
6	-50.17	899.12	-8.88	-0.32	8.88	5.00	1.65	144.19
7	-43.18	735.57	-8.93	-0.33	8.93	5.28	0.68	164.02
8	-15.71	633.97	-8.84	-0.31	8.84	3.93	2.09	112.84
9	12.65	965.00	-8.35	-0.31	8.35	3.44	3.56	115.98

HF: heat of formation, MV: molecular volumes, log *P*: water/octanol partition coefficient, IP: ionization potential, DM: dipolar moment, PSA: polar surface area.

experiments. Stock solution of each compound was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO), and working solutions were prepared with culture medium to obtain concentrations of 0.28 and 1.7  $\mu\text{M}$  (which represent the effective concentration 50 and 99 of **1**, obtained previously by us in *T. crassiceps* cysts of strain ORF) [14]. Culture medium containing 0.25% DMSO was prepared as control. Each cell culture flask contained 25 cysts in 5 mL of culture medium and was incubated for 11 days at 37 °C, with 5% CO<sub>2</sub>. The parasites were observed every day for 11 days with an inverted light microscope (Reichert 569) and the mortality of the cysts was registered. The criteria to assess cyst mortality *in vitro* were loss of vesicular fluid, paralysis of membrane and cyst collapse. The mortality was confirmed on day 11 using the Trypan Blue exclusion test. Each experiment was performed in triplicate.

### 5.3. Molecular modelling studies


Molecular modelling was performed using the Spartan 02 software (Wave function, Irvine, CA, USA). All compounds were built with the fragments method. The conformational analysis was performed with a systematic method [21], using all the rotatable bonds, increment of the dihedral angle was set to 60°, and energy was calculated with Merck Molecular Force Field. After calculation, the lowest energy conformer was retrieved, and was geometry optimized with the AM1 semiempirical method [22], using the keywords: AM1, singlet, precise, full, *T* = 3600, MMOK. From these calculations the following molecular descriptors were obtained: heat of formation (HF), highest occupied molecular orbital (HOMO), lowest unoccupied molecular orbital (LUMO), dipole moment, log *P*, and ionization potential. Optimized molecules were exported to Sybyl V. 7.3 (Tripos, Inc., St. Louis, MI, USA), then polar surface area (PSA) and molecular volume (MV) were calculated [23] for each molecule. log *P*: water/octanol partition coefficient was calculated using the Ghose–Crippen method [24].

### Acknowledgment

This work was supported by grants from PAPIIT-UNAM IN210805. We are grateful to Rosa Isela del Villar, Georgina Duarte, Margarita Guzmán and Marisela Gutiérrez (Facultad de Química, UNAM) for providing all the spectra.

### References

- [1] G. Román, J. Sotelo, O. Del Brutto, A. Flisser, M. Dumas, N. Wadia, Bull. World Health Organ. 78 (2000) 399–406.
- [2] A. Flisser, E. Sartí, M. Lightowers, P. Schantz, Acta Trop. 87 (2003) 43–51.
- [3] O. Takayanagui, Expert Rev. Neurother. 4 (2004) 129–139.
- [4] O. Del Brutto, K. Ross, Ch. Coffey, H. García, Ann. Intern. Med. 145 (2006) 43–52.
- [5] K.U. Bühring, H.W. Dickmann, H. Müller, A. Garbe, H.M. Nowak, Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 3 (1978) 179–190.
- [6] H. Rawden, G. Kokwaro, S. Ward, G. Edwards, Br. J. Clin. Pharmacol. 49 (2000) 313–322.
- [7] E. Góngora-Rivera, J.L. Soto-Hernández, D. González-Esquivel, H.J. Cook, C. Márquez-Caraveo, R. Hernández Dávila, J. Santos-Zambrano, Neurology 66 (2006) 436–438.
- [8] R.O. McCracken, K.B. Lipkowitz, J. Parasitol. 76 (1990) 180–185.
- [9] S. Ram, D.S. Wise, L.L. Worthing, J.M. McCall, L.B. Townsend, J. Med. Chem. 35 (1992) 539–547.
- [10] C.A. Hernández, V.F. Ibarra, F.N. Vera, R. Castillo, Chem. Pharm. Bull. 50 (2002) 649–652.
- [11] O. Soria-Arteche, R. Castillo, A. Hernández-Campos, M. Hurtado-de la Peña, G. Navarrete-Vázquez, J.L. Medina-Franco, K. Gómez-Flores, J. Mex. Chem. Soc. 49 (2005) 349–354.
- [12] J. Valdez, R. Cedillo, A. Hernández-Campos, L. Yépez, F. Hernández-Luis, G. Navarrete-Vázquez, A. Tapia, R. Cortés, M. Hernández, R. Castillo, Bioorg. Med. Chem. 12 (2002) 2221–2224.
- [13] M. Reyes, V.F. Ibarra, M.Y. Vera, A.G. Cantó, A. Hernández, C.A.A. Hernández, R. Castillo, M.A. Villa, Parasitol. Res. 102 (2008) 705–708.
- [14] J.C. Rivera, L. Yépez-Mulia, A. Hernández-Campos, R. Moreno-Esparza, R. Castillo, G. Navarrete-Vázquez, I. Fuentes-Noriega, H. Jung-Cook, Int. J. Pharm. 343 (2007) 159–165.
- [15] F. Palomares, G. Palencia, R. Pérez, D. González-Esquivel, N. Castro, H. Jung, Antimicrob. Agents Chemother. 48 (2004) 2302–2304.
- [16] R.S. Freeman, Can. J. Zool. 40 (1962) 969–990.
- [17] J.D. Smyth, D.P. McManus (Eds.), The Physiology and Biochemistry of Cestodes, Cambridge University Press, Great Britain, 1989, pp. 15–19.
- [18] M.W. Robinson, N.A. Trudgett, L. Hoey, I. Fairweather, J. Mol. Graph. Model. 23 (2004) 275–284.
- [19] R.O. McCracken, K.B. Lipkowitz, J. Parasitol. 76 (1990) 853–864.
- [20] N. Rossi, I. Rivas, M. Hernández, H. Urduneta, Rev. Cubana Med. Trop. 52 (2000) 157–164.
- [21] A.R. Leach, in: K.B. Lipkowitz, D.B. Boyd (Eds.), Reviews in Computational Chemistry, VCH, USA, 1991, pp. 114–135.
- [22] M.S.J. Dewar, E.G. Zoebisch, E.G. Healy, S.J.J.P. Stewart, J. Am. Chem. Soc. 107 (1985) 3902–3909.
- [23] K.B. Lipkowitz, R.O. McCracken, Parasitol. Res. 79 (1993) 475–479.
- [24] A. Ghose, G.M. Crippen, J. Comput. Chem. 7 (1986) 565–568.



**Two novel ternary albendazole-cyclodextrin-polymer systems:  
dissolution, bioavailability and efficacy against *Taenia  
crassiceps* cysts**

Francisca Palomares-Alonso<sup>1,3</sup>,

Cesar Rivas González<sup>3</sup>,

Guadalupe Palencia Hernández<sup>2</sup>,

María Dolores Castillo Montiel<sup>3</sup>,

Iliana González-Hernández<sup>1</sup>,

Nelly Castro-Torres<sup>1</sup>,

Ma. Josefa Bernad-Bernad<sup>3</sup>,

Enrique Pinzón Estrada<sup>4</sup>,

Helgi Jung-Cook<sup>1,3\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Neuropsicofarmacología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía 14269, México DF, México.

<sup>2</sup>Laboratorio de Neuroinmunología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía 14269, México DF, México.

<sup>3</sup>Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México.

<sup>4</sup>Facultad de Medicina, Departamento de Bioterio. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México.

\*Corresponding author: Helgi Jung-Cook, PhD, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Insurgentes Sur 3877, Col. La fama, Tlalpan 14269, México City, México  
Phone and Fax: (55)-54-24-08-08, E-mail: helgi@servidor.unam.mx



## **ABSTRACT**

The effect of two water-soluble polymers: pectin and polyvinylpyrrolidone in combination with  $\beta$ -cyclodextrin, on the dissolution, bioavailability and cysticidal efficacy of albendazole was evaluated using a commercial suspension as reference product. The dissolution of the albendazole- $\beta$ -cyclodextrin-pectin formulation was slow and incomplete (44.7 %). No statistical differences in Cmax and AUC were found between this formulation and the reference. Also its cysticidal efficacy (33 %) was similar to the reference (38 %). The albendazole- $\beta$ -cyclodextrin-polyvinylpyrrolidone formulation exhibited the highest dissolution rate (78.5%) and its bioavailability was also significantly increased (2.3 fold). Additionally, the cysticidal activity of this formulation (83%) was greater. Our results suggest that the ternary system of albendazole- $\beta$ -cyclodextrin-polyvinylpyrrolidone could be a potential alternative for the treatment of systemic helminthic diseases and it is worth to continue its preclinical evaluation.

## 1. Introduction

Although albendazole (ABZ) is the drug of choice for neurocysticercosis treatment, it is well known that it is poorly and erratically absorbed from the gastro-intestinal tract which is related to its low water solubility. As a result a high inter-individual variability in plasma levels and efficacy has been found (Jung et al., 1998; Del Brutto et al., 2006). Different strategies have been developed in order to improve its aqueous solubility and bioavailability, such as the use of surfactants (polysorbate 80, sodium taurocholate and polyethylene glycol) or polymers (polyvinyl pyrrolidone, hydroxy propyl methyl cellulose) (Redondo et al., 1998; Daniel-Mwambete et al., 2004; Kalaiselvan et al., 2006). The complexation with cyclodextrins has also been studied. Castillo et al. (1999), who evaluated the influence of three different types of  $\beta$ -cyclodextrins on the solubility of ABZ and found that the highest solubilization effect was achieved with methyl- $\beta$ -cyclodextrin.

Several studies have been performed using solid complexes of albendazole-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ CD): García-Rodríguez et al. (2001), showed that the anthelmintic activity and plasma concentrations of the active metabolite of ABZ (albendazole sulphoxide, ABZSO) was significantly increased. Casulli et al. (2006) found that the AUC and the efficacy against larvae of *Trichinella spiralis* of the same complex were higher than those obtained for ABZ alone. Evrard et al. (2002) showed that the bioavailability of ABZ in HP- $\beta$ CD was 37% higher than that obtained with a commercial suspension. The ABZ-HP- $\beta$ CD complex has also been evaluated in humans, showing that the relative bioavailability of ABZ was enhanced 9.7 fold compared to the commercial tablets; however, in most of the subjects the formulation caused diarrhea (Rigter et al., 2004).

For a variety of reasons, including cost, production capabilities and toxicology, the amount of cyclodextrin that can be included in drug formulations is limited. It has been found that the addition of water soluble polymers increase the complexation efficiency and solubilizing effect of cyclodextrins in the drug-cyclodextrin complexes reducing its amount in the formulation (Loftsson et al., 1994; Loftsson et al., 1998). In the case of glimepiride and naproxen, it has been found that the ternary systems containing  $\beta$ CD and polyvinylpyrrolidone

(PVP), showed higher dissolution efficiency compared to the corresponding binary system (Valero et al., 2003; Ammar et al., 2006). The change in solubility of some benzimidazole drugs with pectins has also been reported (Khalikov et al., 1995). Up to date there is no information available about the behavior of ABZ in ternary systems, therefore the aim of this study was to evaluate the effect of water-soluble polymers: pectin and polyvinylpyrrolidone, in combination with  $\beta$ -cyclodextrin, on the dissolution, bioavailability and efficacy of ABZ.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Chemicals and reagents*

ABZ was kindly donated by GlaxoSmithKline (México), ABZSO was synthesized by Dr. Rafael Castillo (Facultad de Química, UNAM, México),  $\beta$ -cyclodextrin ( $\beta$ CD, molecular weight 1135) was from Cerestar (USA), carbamazepine (CBZ) and polyvinylpyrrolidone (PVP, K30 of molecular weight 360 000) were from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), pectin DE31 (PEC, from HELM, México); methanol, ether, chloroform, dichloromethane were HPLC grade (J.T. Baker). Water was deionized using a water purification system (MilliQ system equipment, Millipore). All other reagents were of analytical grade.

### *2.2. Animals*

Experimental protocols were approved by the Institutional Committee of Research of the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. The study was carried out according to the “Guide to the Care and Use of Experimental Animal Care” and the guidelines for the care and use of laboratory animals of the Mexican directive (NOM-062-200-199). During all experiments the animals were housed in animal facilities under controlled environmental conditions (24-25 °C temperature and 55  $\pm$  5% humidity) and 12 h light/dark cycle. Food and water were provided *ad libitum*.

### *2.3. Preparation of ternary $\beta$ -cyclodextrin systems*

The preparation of solid systems between  $\beta$ CD and ABZ was performed by the kneading method, which is described below. In all cases the molar ratio between  $\beta$ CD and ABZ was kept 1:1. A weighed quantity of  $\beta$ CD was placed in a mortar and a small amount of

distilled water was added and mixed to obtain a homogeneous paste. ABZ was slowly added and the mixture was kneaded until a homogeneous consistence was obtained. Ternary systems of albendazole- $\beta$ -cyclodextrin-pectin (ABZ- $\beta$ CD-PEC) or albendazole- $\beta$ -cyclodextrin-polyvinylpyrrolidone (ABZ- $\beta$ CD-PVP) were prepared by adding PVP or PEC to the binary system in a concentration of 5% (w/w). The products were dried and sieved through a 0.25 mm mesh.

#### *2.4. Dissolutions studies*

ABZ (pure) and ABZ- $\beta$ CD-polymer tablets were prepared by direct compression without excipients. Dissolution studies were performed using a USP Vankel UK700-8 apparatus. The dissolution medium used was 900 mL of degassed 0.1N HCl at  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ . The paddle rotation speed was 50 rpm. In all experiments, 2 mL of dissolution samples were withdrawn at 5, 10, 20, 30, 45, 60 and 90 min without replacement of medium. Six replicates for each product were used. Samples were filtered through 0.45 $\mu\text{m}$  membranes and assayed for ABZ content by a spectrophotometric method at 291nm (UV/VIS Shimadzu Spectrophotometer). The method was linear from 2 - 22  $\mu\text{g/mL}$ . Intra-and interday precision values were less than 2%. For every trial, a standard curve was prepared. Cumulative percentages of drug released were calculated for each product.

#### *2.5. Bioavailability study*

The study was performed in male Wistar rats weighing  $280 \pm 20$  g. The animals were fasted overnight prior to the experiment and were given water freely.

Aqueous dispersions of ABZ- $\beta$ CD-PEC and ABZ- $\beta$ CD-PVP were prepared for this study. A commercial suspension (Zentel®, GlaxoSmithKline, México) was used as the reference product for comparison. Formulations were administered orally by a bucco-gastric tube at a dose of 10 mg ABZ/kg of body weight. Rats were anaesthetized and a catheter was implanted into the vein tail; blood samples of 0.5 mL were taken from the tail vein before drug administration and after 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 8, 10 and 12 h (n=6 per sampling time). Blood samples were collected into heparinized tubes, centrifuged for 15 min at 3000 rpm and the plasma samples were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$  until HPLC analysis.



## 2.6. Drug analysis


Plasma aliquots of 200  $\mu\text{L}$  were mixed with 20  $\mu\text{L}$  of carbamazepine (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) as internal standard. The sample was extracted with 4 mL of ether-dichloromethane-chloroform (60:30:10 (v/v/v)) by vortex mixing for 5 min. After centrifugation at 3000 rpm, the upper organic layer was removed and evaporated to dryness at 40  $^{\circ}\text{C}$  under a nitrogen stream. The residue was reconstituted with 50  $\mu\text{L}$  of methanol-water-chloroform (70:30:5 (v/v/v)), shaken on a vortex and a 10  $\mu\text{L}$  aliquot was injected onto the HPLC system. Analysis was performed on an Agilent chromatographic system (1100 series) equipped with a multisolvent delivery system and an autosampler. The column was a Symmetry RP<sub>18</sub> 5  $\mu\text{M}$  (4.6 x 250 mm) with a mobile phase composed of methanol-phosphate buffer 25 mM, pH 5.7 (65:35). The flow rate was kept constant at 0.4 mL/min and the detection was carried out by UV at 295 nm.

Under these conditions the retention time for ABZSO was 9.2 min. Data showed that the method was linear over the range between 50-5000 ng/mL ( $r^2 = 0.998$ ), with precision of 10% and accuracies of  $98 \pm 5\%$ . The detection and quantification limits were 25 and 50 ng/mL respectively. The ABZSO plasma concentrations were expressed as mean $\pm$ SD. The pharmacokinetic parameters of ABZSO were determined by a non-compartmental analysis using WINOLIN software V. 5.0.

## 2.7. Cysticidal activity

Studies were performed on *Taenia crassiceps* cysts (WFU strain), which have been used previously as a model for the evaluation of cysticidal drugs (Palomares et al., 2004). Male BALB/c mice were infected with *T. crassiceps* by intraperitoneal injection of 30-35 cysts per mouse; the parasites were previously suspended in 0.5 mL of sterile 0.9% saline solution. After one month of infection, the animals were divided randomly into five experimental groups (six mice per group) as follows: (1) Control group, which received water as placebo; (2) commercial suspension group (Zentel®, GlaxoSmithKline, México); (3) ABZ- $\beta$ CD-PEC group and (4) ABZ- $\beta$ CD-PVP group.

Formulations for this study were prepared as solid dispersions in water at a concentration of 40 mg of ABZ/mL and stored at -20  $^{\circ}\text{C}$  for a period of 5 days maximum.



Zentel containing 40 mg/mL of ABZ was used as reference. Each mouse received 150 mg of ABZ/kg/day of each formulation intragastrically, during 30 consecutive days. On day 31 mice were killed by cervical dislocation, and the cysts were carefully removed from the peritoneal cavity. The parasites were washed with sterile 0.9 % saline solution, and parasite dry weight was determined as follows: the parasites were homogenized in a Poly-Tron PT 2100 homogenizer (Kinematica, Switzerland) to obtain the membranes only, the material was centrifuged for 20 min at 5000 rpm and the residue was lyophilized (freeze-drying method) for 4 h. Parasite residue weight was recorded using an analytical balance (Mettler 2500). The weight of recovered cysts from each experimental group was expressed as mean  $\pm$  SD. The cysticidal efficacy was expressed as the percentage of parasite reduction and was calculated by comparing the dry weight from the treated experimental animals with that obtained from the control mice.

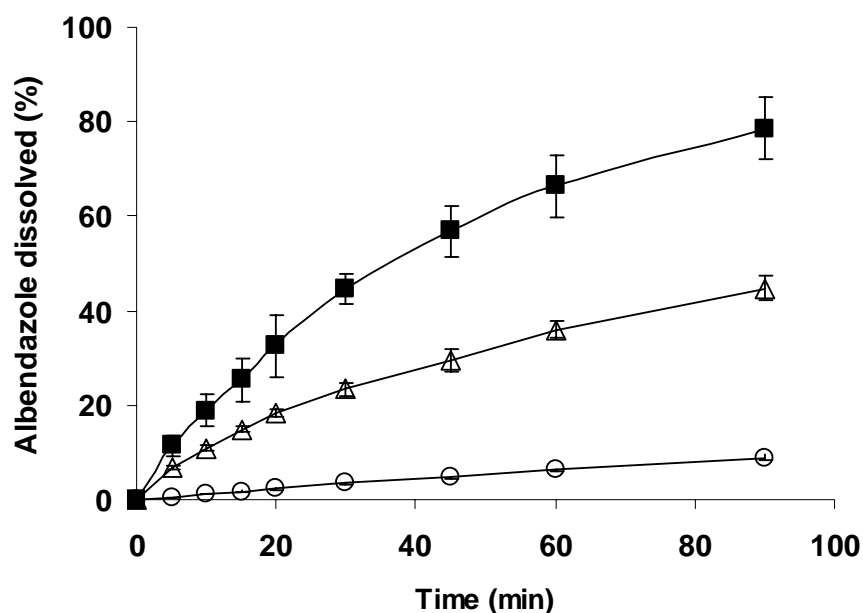
### *2.7. Statistical analysis*

In order to compare the percentage of ABZ dissolved at 90 min among the formulations, a one-way analysis of variance (ANOVA) test followed by the Dunnet's test was conducted considering pure ABZ as control. The pharmacokinetic parameters of ABZSO ( $C_{max}$ ,  $T_{max}$  and AUC) as well as the efficacy of the drug formulations were analyzed using the same procedure considering Zentel as the reference product. Data analysis was carried out using SPSS software (V. 15.0) and differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Dissolutions study

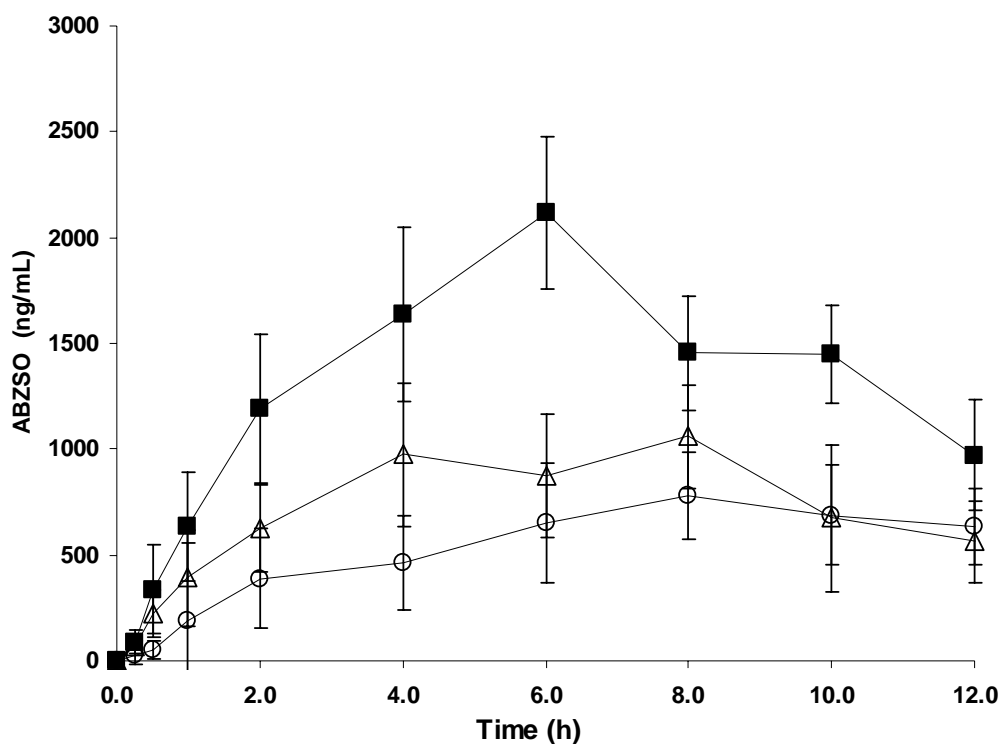
Figure 1 shows the dissolution profiles of the different formulations under study. The results show that the dissolution rates were appreciably faster in the ternary systems in comparison with ABZ. The percentage of drug dissolved at 90 min was  $9 \pm 0.75$  %,  $44.7 \pm 2.4$  % and  $78.5 \pm 6.5$  % for ABZ alone, ABZ- $\beta$ CD-PEC and ABZ- $\beta$ CD-PVP respectively. The release was also affected by the kind of polymer used, being lower when PEC was used instead PVP in the formulation. The highest dissolution rate was found with the ABZ- $\beta$ CD-PVP system.



**Fig. 1.** Dissolution profiles for ABZ,  $\circ$ ; ABZ- $\beta$ CD-PEC,  $\triangle$  and ABZ- $\beta$ CD-PVP,  $\blacksquare$ ; in HCl 0.1N. Each point represents mean  $\pm$  SD, n=6.

### 3.2. Bioavailability study

Figure 2 illustrates the mean plasma concentrations of ABZSO obtained after the oral administration of the different formulations using Zentel as reference. The pharmacokinetic parameters are shown in Table 1. When the ternary system ABZ- $\beta$ CD-PEC was compared with the reference product, no significant differences among C<sub>max</sub> and AUC values were found ( $p>0.05$ ). On the other hand, the ABZ- $\beta$ CD-PVP formulation increased significantly the bioavailability of ABZ. C<sub>max</sub> was 2.3 times higher than that obtained with Zentel and 1.68 times higher than that obtained with the system ABZ- $\beta$ CD-PEC.



**Fig. 2.** Plasma levels of ABZSO versus time (h) after a single oral dose (10 mg/kg) of Zentel, ○; ABZ- $\beta$ CD-PEC, △ and ABZ- $\beta$ CD-PVP, ■. Each point represents the mean  $\pm$  SE, n=6.

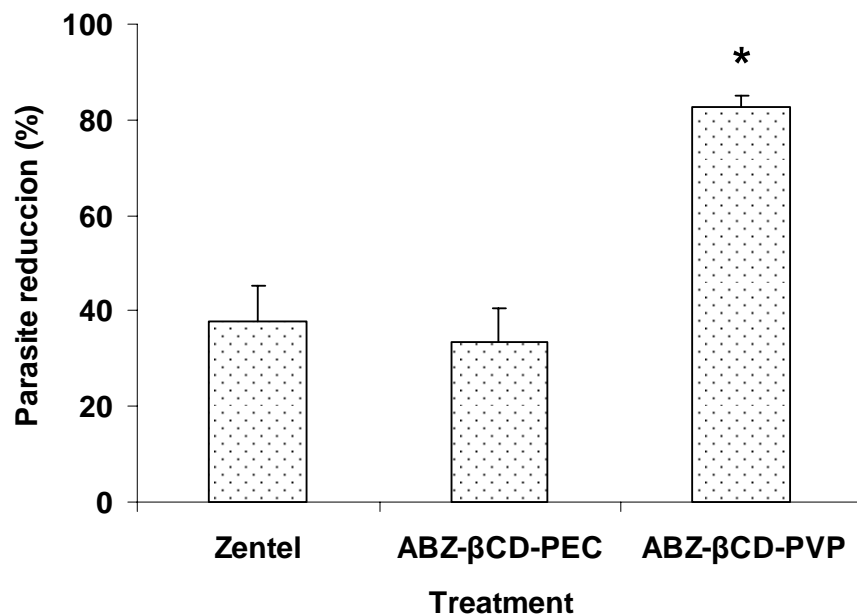
**Table 1.** Pharmacokinetic parameters of ABZSO after an oral dose of 10 mg/kg of the different albendazole formulations.

Formulation	Pharmacokinetic parameters		
	C <sub>max</sub> (ng/mL)	T <sub>max</sub> (h)	AUC <sub>0-12</sub> (ng/h/mL)
Zentel	859±73.1	8.33±0.8	6855±1035
ABZ-βCD-PEC	1182±101.3	7.43±0.6	9381±1002
ABZ-βCD-PVP	1993±178.2 <sup>a</sup>	6.33±0.3 <sup>a</sup>	15874±1848 <sup>a</sup>

Data are expressed as mean ± SE, n=6. a= significantly different from Zentel (p < 0.05).

### 3.3. Cysticidal activity

Figure 3 shows the cysticidal activity of the different formulations and Zentel against *Taenia crassiceps* cysts. As can be seen, a significant parasite reduction in all treatments was obtained (p<0.05). The mean percentage of parasite reduction after ABZ-βCD-PEC, Zentel, and ABZ-βCD-PVP was: 33%, 38% and 83% respectively. No differences were found between the efficacy obtained with the ternary ABZ-βCD-PEC formulation and Zentel. A significant improvement in the efficacy was found with the ternary system ABZ-βCD-PVP (p<0.05). The efficacy showed an enhancement of 2.5 fold compared to Zentel. All formulations were well tolerated and there were no abnormalities in the behavior, food/water consumption and general activity of the animals throughout the study.




**Fig. 3.** Cysticidal efficacy results expressed as the percentages of reduction in the parasite weight obtained with the different formulations. Values represent the mean  $\pm$  SD, n=6; \*p<0.05 against group treated with Zentel.

#### 4. Discussion

The natural cyclodextrins, in particular  $\beta$ -cyclodextrin, have limited solubility in water and their complexes with lipophilic water-insoluble drugs often results in precipitation of solid drug-cyclodextrin complexes (Stella and He, 2008). Taking into account that water-soluble polymers enhance the aqueous solubility of  $\beta$ -cyclodextrin, we used this approach to evaluate the effect of two water soluble polymers on the bioavailability and efficacy of albendazole. The results showed an increase in the drug dissolution rate when the ternary ABZ- $\beta$ CD-PEC formulation was used which was almost 5 fold in comparison with that obtained with the drug alone.

The increase in solubility could be associated to the interaction between  $\beta$ -cyclodextrin and the polymer. Up to date there are no reports about the influence of PEC on the solubility of  $\beta$ -cyclodextrin and other studies are required to explain the results.




In the case of the ABZ- $\beta$ CD-PVP the highest in dissolution rate was found. The increase in dissolution rate was 8.7 fold than that obtained with the drug alone and 1.7 fold than that obtained with the ABZ- $\beta$ CD-PEC formulation. Several studies have shown that PVP improves the wettability and dispersability of low solubility drugs (Patel et al., 2007). Also, Torrado et al. (1996) showed that the ABZ dissolution rate and the solubility coefficient increased when ABZ was mixed with PVP as solid dispersion. In the present study the increase in the dissolution rate could be attributed to the synergic solubilizing effect of the polymer and the  $\beta$ -cyclodextrin. These results are in agreement with previous studies which have shown the positive effect of addition of small amounts of PVP on the complexing and solubilizing abilities of cyclodextrins, as observed in the naproxen- $\beta$ CD-PVP and vinpocetine- $\beta$ CD-PVP systems (Valero et al., 2006; Ribeiro et al., 2003).

Furthermore, it has been shown that PVP improves the amorphous state stability via an antiplasticizing effect (Kalaiselvan et al., 2006). This is important for ABZ, since during storage conversion from amorphous to the crystalline state could take place, affecting the drug solubility and its dissolution rate.

The results of bioavailability showed that the ABZ- $\beta$ CD-PEC formulation was inefficient to enhance the bioavailability of ABZ. The absorption rate was also similar to that observed with the commercial suspension, since no differences in  $C_{max}$  was found. This fact could be associated to the ability of PEC to promote *in vivo* gelation (Itoh et al., 2007), which could affect the drug delivery in spite of the  $\beta$ CD presence.

When the ABZ- $\beta$ CD-PVP was evaluated an increase in the ABZ bioavailability was found. As seen in table 1 this increase was reflected in the  $C_{max}$  and also in AUC. The enhanced in bioavailability was related with the increase in dissolution rate, which lead to better absorption. This improve could be explained by different factors: a) PVP enhanced the solubility of  $\beta$ CD, b) PVP affected the permeability of the gastro-intestinal membrane increasing the drug partitioning process across intestinal barrier (Saha and Kou, 2000) or c) PVP enhanced the solubility of the free drug in the system.



In terms of efficacy, the ABZ- $\beta$ CD-PEC showed a similar activity to that obtained with Zentel, while the ABZ- $\beta$ CD-PVP formulation was the most efficient to reduce the cysts. The increase in the cysticidal activity could be a consequence of the increase in the systemic availability of ABZSO, since a direct relationship between the bioavailability parameters ( $C_{max}$  and AUC) and the efficacy was found. Our results are in accordance with a previous study in which the cysticidal activity of ABZSO on *T. crassiceps* cysts was time and concentration dependent (Palomares et al., 2004).

## 5. Conclusion

In summary, the ternary system ABZ- $\beta$ CD-PVP improved significantly the dissolution rate, cysticidal efficacy and the bioavailability of ABZ. Considering that among cyclodextrins, the parent  $\beta$ -CD has a low cost of production, the ternary system ABZ- $\beta$ CD-PVP could be a potential pharmaceutical alternative in the treatment of systemic helminthic diseases in developing countries and it is worth to continue its evaluation.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Guadalupe Vidal Cantú and Rodolfo Pérez Madrigal for technical assistance.

## References

- Ammar, H.O., Salama, H.A., Ghorab, M., Mahmoud, A.A., 2006. Formulation and biological evaluation of glimepiride-cyclodextrin-polymer systems. *Int. J. Pharm.* 309, 129-138.
- Castillo, J., Palomo-Canales, J., García, J., Bolas, F., Torrado, J., 1999. Preparation and characterization of albendazol  $\beta$ -cyclodextrin complexes. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 25, 1241-1248.



- Casulli, A., Gomez, M.A., Gallinella, B., Turchetto, L., Poizo, E., 2006. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin improves the effectiveness of albendazole against encapsulated larvae of *Trichinella spiralis* in a murine model. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 886-890.
- Daniel-Mwambete, K., Torrado, S., Cuesta-Bandera, C., Ponce-Gordo, F., Torrado, J.J., 2004. The effect of solubilization on the bioavailability of three benzimidazole carbamate drugs. *Int. J. Pharm.* 272, 29-36.
- Del Brutto, O.H., Roos, K.L., Coffey, C.S., García, H.H., 2006. Meta-analysis: Cysticidal drugs for neurocysticercosis: albendazole and praziquantel. *Ann. Intern. Med.* 145, 43-51.
- Evrard, B., Chiap, P., DeTullio, P., Ghalmi, F., Piel, G., Van Hess, T., Crommen, J., Losson, B., Delattre, L., 2002. Oral bioavailability in sheep of albendazole from a suspension and from a solution containing hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin. *J. Cont. Rel.* 85, 45-50.
- García-Rodríguez, J., Torrado, J., Bolas, F., 2001. Improving bioavailability and anthelmintic activity of albendazole by preparing albendazole-cyclodextrin complexes. *Parasite.* 8, 188-190.
- Itoh, K., Hirayama, T., Takahashi, A., Kubo, W., Miyazaki, S., Dairaku, M., Togashi, M., Mikami, R., Attwood, D., 2007. In situ gelling pectin formulations for oral drug delivery at high gastric pH. *Int. J. Pharm.* 20, 90-96.
- Jung, H., Medina, L., García, L., Fuentes, I., Esparza, R., 1998. Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of the drug and its metabolite, albendazole sulphoxide. *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 43-48.
- Kalaiselvan, R., Mohnata, G.P., Manna, P.K., Manimekalai, A., 2006. Solid-phase preparation and characterization of albendazole solid dispersion. *ARS Pharm.* 47, 91-107.
- Kalaiselvan, R., Mohanta, G.P., Manna, P.K., Manavalan, R., 2006. Inhibition of albendazole crystallization in polyvinylpyrrolidone solid molecular dispersions. *Pharmazie.* 61, 618-624.
- Khalikov, S.S., Kutlymuratov, A.P., Kristallovich, E.L., Abdullaev, N.D., Knodzhaeva, M.A., Sadykov, T., Aripov, KnN., 1995. Modification on the solubility of benzimidazole drugs on mechanical treatment with pectins. *Chem Nat Comp.* 1995, 31: 460-464.

- Loftsson, T., Friðriksdóttir, H., Sigurðadóttir, A.M., Ueda, H., 1994. The effect of water-soluble polymers on drug-cyclodextrin complexation. *Int. J. Pharm.* 110, 169-177.
- Loftsson, T., Friðriksdóttir, H., 1998. The effect of water-soluble polymers on the aqueous solubility and complexing abilities of  $\beta$ -cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 163, 115-121.
- Palomares, F., Palencia, G., Perez, R., Gonzalez-Esquivel, D., Castro, N., Jung, C.H., 2004. *In vitro* effects of albendazole sulphoxide and praziquantel against *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* cysts. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48, 1051-1054.
- Patel, R.P., Patel, M.M., 2007. Physicochemical characterization and dissolution study of solid dispersion of lovastatin with polyethylene glycol 4000 and polyvinylpyrrolidone K30. *Pharm. Dev. Technol.* 12, 21-33.
- Redondo, P.A., Álvarez, A.I., Garcia, J.L., Villaverde, C., Prieto, J.G., 1998. Influence of surfactants on oral bioavailability of albendazole based on the formation of the sulphoxide metabolites in rats. *Biopharm. Drug. Dispos.* 19, 65-70.
- Ribeiro, L., Ferreira, D., Veiga, F., 2003. Physicochemical investigation of the effect of water-soluble polymers on vinpocetine complexation with  $\beta$ -cyclodextrin and its sulfobutyl ether derivative in solution and solid state. *Eur. J. Pharm. Sci.* 20, 253-266.
- Rigter, I.M., Schipper, H.G., Koopmans, R.P., Van Kan, H.J.M., Frijlink, H.W., Kager, P.A., Guchelaar, H.J., 2004. Relative bioavailability of three newly developed albendazole formulations: a randomized crossover study with healthy volunteers. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 48, 1051-1054.
- Saha, P., Kou, J.H., 2000. Effect of solubilizing excipients on the permeation of poorly water-soluble compounds across Caco-2 cell monolayers. *Europ. J. Pharm. Biopharm.* 50, 403-411.
- Stella, V.J., He, Q., 2008. Cyclodextrins. *Toxicol. Pathol.* 36, 30-42.
- Torrado, S., Torrado, S., Torrado, J.J., Cadórniga, R., 1996. Preparation, dissolution and characterization of albendazole solid dispersions. *Int. J. Pharm.* 140, 247-250.
- Valero, M., Pérez-Revuelta, B.I., Rodríguez, L.J., 2003. Effect of PVP K-25 on the formation of the naproxen:  $\beta$ -cyclodextrin complex. *Int. J. Pharm.* 253, 97-110.